

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁵ : C12N 15/52, 15/31, C12Q 1/25 C12Q 1/32, 1/68, C12P 21/02 C07K 13/00, C12P 21/08	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/07942 (43) Date de publication internationale: 14 mai 1992 (14.05.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00855 (22) Date de dépôt international: 29 octobre 1991 (29.10.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/13579 31 octobre 1990 (31.10.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : ARTHUR, Michel [CH/FR]; 9, rue du Faubourg-S.-Martin, F-75010 Paris (FR). DUKTA-MALEN, Sylvie [FR/FR]; 1, sentier des Rossignols, F-94260 Fresnes (FR). MOLINAS, Catherine [FR/FR]; 118, rue Marcadet, F-75018 Paris (FR). COURVALIN, Patrice [FR/FR]; 13, rue Emile-Duclaux, F-75015 Paris (FR).		(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc. ; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>

(54) Title: POLYPEPTIDES INVOLVED IN THE EXPRESSION OF RESISTANCE TO GLYCOPEPTIDIC ANTIBIOTICS

(54) Titre: POLYPEPTIDES IMPLIQUES DANS L'EXPRESSION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES GLYCOPEPTIDIQUES

V1 : GGX GAA GAT GGX TCX TTX CAA GGX
G C AG C G
A

V2 : AAT ACX ATX CCX GGX TTT AC
C T C
C

(57) Abstract

Polypeptide composition characterized in that it comprises at least one protein or protein or part thereof chosen from amino acid sequences identified in the list of sequences by SEQ ID NO 1 (VanH), SEQ ID NO 2 (VanA), SEQ ID NO 3 (VanX), SEQ ID NO 19 (VanC), or any protein or part thereof recognized by the antibodies directed against VanH, VanA, VanX or VanC, or protein or part thereof coded by a sequence hybridizing with one of the nucleotide concatenations identified in the list of sequences by SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9 or SEQ ID NO 10 or with one of V1 or V2 sequences in stringent or slightly stringent conditions. The invention also concerns nucleotide sequences coding for these polypeptides and their use in the diagnosis of resistance to glycopeptides.

(57) Abrégé

L'invention concerne une composition de polypeptides, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une protéine ou partie de protéine choisie parmi les séquences d'acides aminés identifiées dans la liste des séquences par SEQ ID NO 1 (VanH), SEQ ID NO 2 (VanA), SEQ ID NO 3 (VanX) ou SEQ ID NO 19 (VanC), ou toute protéine ou partie de protéine reconnue par les anticorps dirigés contre VanH, VanA, VanX ou VanC, ou toute protéine ou partie de protéine codée par une séquence hybridant avec l'un des enchaînements nucléotidiques identifiés dans la liste des séquences par SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9 ou SEQ ID NO 10 ou avec l'une des séquences V1 ou V2 dans des conditions stringentes ou peu stringentes. L'invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour ces polypeptides ainsi que leur utilisation pour le diagnostic à une résistance aux glycopeptides.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

+ Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique.

POLYPEPTIDES IMPLIQUES DANS L'EXPRESSION DE LA
RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES GLYCOPEPTIDES.

L'invention concerne les polypeptides associés à l'expression de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment chez des bactéries à Gram-positif, en particulier de la famille des cocci à Gram-positif. L'invention vise également une séquence nucléotidique codant pour ces polypeptides. Elle concerne aussi l'utilisation de ces polypeptides et de leur séquence nucléotidique en tant que moyens de détection in vitro d'une résistance à des glycopeptides. Parmi les cocci à Gram-positif, l'invention vise tout particulièrement les entérocoques, les streptocoques et les staphylocoques qui présentent un intérêt particulier pour la mise en oeuvre de l'invention.

Les glycopeptides, parmi lesquels la vancomycine et la teicoplanine, sont des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne. Ces antibiotiques sont très utilisés pour le traitement des infections sévères dues à des cocci à Gram-positif (entérocoques, streptocoques et staphylocoques), en particulier dans les cas d'allergie et de résistance aux pénicillines. Malgré un long usage clinique de la vancomycine, cet antibiotique est resté actif sur la quasi totalité des souches jusqu'en 1986, date à laquelle ont été isolées les premières souches résistantes. Depuis, la résistance aux glycopeptides a été détectée par de nombreux microbiologistes en Europe et aux Etats Unis, notamment chez des souches isolées de malades immunodéprimés, rendant nécessaire une

évaluation systématique de la sensibilité des germes en milieu hospitalier.

L'activité des glycopeptides dépend de la formation d'un complexe entre l'antibiotique et les précurseurs du peptidoglycane, plus que de l'interaction directe avec des enzymes du métabolisme de la paroi cellulaire. En particulier on a constaté que les glycopeptides se fixent aux résidus terminaux D-alanyl-D-alanine (D-ala-D-ala) des précurseurs du peptidoglycane.

L'émergence récente d'une résistance aux glycopeptides notamment chez des entérocoques, a conduit à l'obtention de certains résultats au niveau de la connaissance des facteurs conférant cette résistance.

On a par exemple constaté dans une souche d'entérocoque particulière, Enterococcus faecium BM4147, que le déterminant de la résistance aux glycopeptides était localisé sur un plasmide de 34 kb, le plasmide PIP816. Ce déterminant a été cloné dans E.coli (Brisson Noël et al, 1990, Antimicrob Agents Chemother 34, 924-927).

D'après les résultats obtenus jusqu'à présent, la résistance aux glycopeptides était associée avec la production d'une protéine de poids moléculaire d'environ 40 kDa, la synthèse de cette protéine étant induite par des concentrations sous-inhibitrices de certains glycopeptides comme la vancomycine.

En réalisant une étude plus approfondie de la résistance de certaines souches de cocci à Gram-positif vis à vis de glycopeptides notamment de la vancomycine ou de la teicoplanine, les inventeurs ont constaté que cette résistance serait liée à l'expression de plusieurs protéines ou polypeptides codés par des

séquences généralement portées par des plasmides chez les souches résistantes. Les nouveaux résultats obtenus par les inventeurs permettent en outre de distinguer les gènes codant pour deux phénotypes de résistance, d'une part les souches hautement résistantes aux glycopeptides, d'autre part des souches résistantes à un bas niveau.

Par souche résistante à un haut niveau, on entend une souche de bactérie en particulier une souche de cocci à Gram-positif pour laquelle les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de vancomycine et de teicoplanine sont respectivement supérieures à 32 et 8 $\mu\text{g/ml}$. Les CMI de la vancomycine vis à vis des souches résistantes à bas niveau sont comprises entre 16 et 32 $\mu\text{g/ml}$. Ces souches sont apparemment sensibles à la teicoplanine.

Les inventeurs ont isolé et purifié, parmi les composants nécessaires à l'expression de la résistance aux glycopeptides, une protéine particulière dénommée VANA ou VanA présentant une certaine homologie avec des D-alanine-D-alanine ligases. VanA est néanmoins fonctionnellement distincte des ligases.

On désignera en principe par "van..." une séquence de gène et par "Van..." une séquence d'acides aminés.

L'invention concerne des polypeptides ou protéines impliqués dans l'expression d'une résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides et notamment à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ainsi que les séquences nucléotidiques codant pour de tels complexes.

L'invention vise également des sondes nucléotidiques utilisables pour la détection d'une résistance aux glycopeptides, notamment par la réaction

de polymérisation en chaîne (PCR), ou par des tests faisant intervenir des anticorps.

L'invention concerne une composition de polypeptides, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une protéine ou partie de protéine choisie parmi les séquences d'acides aminés identifiées dans la liste des séquences par SED ID NO 1 (VanH), SEQ ID NO 2 (VanA), SEQ ID NO 3 (VanX) ou SEQ ID NO 19 (VanC), ou toute protéine ou partie de protéine reconnue par les anticorps dirigés contre VanH, VanA, VanX ou VanC, ou toute protéine ou partie de protéine codée par une séquence hybridant avec l'un des enchaînements nucléotidiques identifiés dans la liste des séquences par SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10 ou SEQ ID NO 21 ou avec l'une des séquences V1 ou V2 suivantes dans des conditions stringentes ou peu stringentes :

V1 : GGX GAA GAT GGX TCX TTX CAA GGX

G C AG C G
A

V2 : AAT ACX ATX CCX GGX TTT AC

C T C
C

Une première composition particulière selon l'invention impliquée dans l'expression de la résistance aux glycopeptides est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 3 protéines ou toute partie de l'une ou plusieurs de ces protéines nécessaires pour conférer à des bactéries à Gram-positif, la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ou de favoriser cette résistance, en particulier dans des souches de la famille des cocci à Gram-positif, ces protéines ou parties de protéines étant

- a) reconnues par des anticorps dirigés contre l'une des séquences identifiées dans la liste des séquences par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3,
- b) soit codées par des gènes comportant une séquence identifiée par SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9 ou SEQ ID NO 10 ou hybridant avec l'une de ces séquences ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes ou peu stringentes ou avec les séquences V1 ou V2.

Ces séquences sont encore désignées respectivement par ORF3, ORF1 contenant le gène vanH, vanA (ou ORF2) ; elles caractérisent les protéines de résistance telles qu'obtenues à partir de la souche Enterococcus faecium BM4147 décrite par Leclercq et al (N Engl J Med 319:157-161).

Une autre protéine, VanC, apparentée à des D-Ala-D-Ala ligases mais de spécificité différente a été caractérisée chez Enterococcus gallinarum BM4173 ; le gène vanC présente des domaines ayant une homologie suffisante avec le gène vanA, pour que des sondes correspondant à des régions déterminées de vanA permettent sa détection.

E. gallinarum est un isolat résistant de façon constitutive à de faibles niveaux de vancomycine (Dutka-Malen et al, Antimicrob. Agents Chemother 34 (1990b) 1875-1879).

Par l'expression "polypeptides" on entend tout enchaînement d'acides aminés pouvant contenir des protéines, ou d'une taille inférieure à celle d'une protéine.

Les conditions de stringence dont il est question ci-dessus sont déterminées selon les modalités habituelles s'agissant de l'hybridation de séquences

nucléotidiques. A titre d'exemple, s'agissant des séquences hybridant avec la séquence du gène vanA (SEQ ID NO 8) on pourra appliquer les conditions suivantes :

- pour une hybridation dans des conditions de forte stringence :
 - * température de la réaction 65°C pendant une nuit dans une solution contenant 0,1% de SDS, 0,7% de lait en poudre écrémé, 6xSSC (1xSSC=0,15M NaCl et 0,015M de citrate de sodium à pH=7,0)
 - * lavages à 65°C dans 2xSSC-0,1% SDS ;
- pour une hybridation dans des conditions peu stringentes, la température d'hybridation est 60°C pendant une nuit et la température des lavages 45°C.

L'expression d'une résistance à des glycopeptides peut se traduire par la persistance d'une infection due à des germes habituellement sensibles aux glycopeptides.

Un polypeptide ou une protéine est nécessaire à l'expression d'une résistance aux glycopeptides, dès lors que son absence rend la souche qui contient ce polypeptide ou cette protéine, plus sensible aux glycopeptides et que ce polypeptide ou protéine n'est pas présent chez les souches sensibles.

Différents niveaux de résistance aux glycopeptides existent parmi les souches de cocci à Gram-positif notamment.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les polypeptides entrant dans la composition ci-dessus définie, correspond à l'association des protéines indentifiées dans la liste des séquences par SEQ ID NO 1 (VanH), SEQ ID NO 2 (VanA), SEQ ID NO 3 (VanX).

Les inventeurs ont donc constaté que l'expression d'une résistance aux glycopeptides chez des bactéries à Gram-positif, nécessite l'expression d'au moins trois protéines ou de polypeptides issus de ces protéines.

Selon un premier mode de réalisation particulier de l'invention, les polypeptides de la composition sont encore caractérisés en ce que les séquences d'acides aminés nécessaires à l'expression de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides sont sous le contrôle d'éléments de régulation, notamment des protéines correspondant aux séquences désignées par SEQ ID NO 4 ou SEQ ID NO 5 dans la liste des séquences, et qui correspondent respectivement à une séquence R de régulation, et à une séquence S senseur.

VanS et VanR constituent un système de régulation à deux composants, VanR étant un activateur de transcription et VanS stimulant la transcription dépendante de VanR. VanS est susceptible de moduler le niveau de phosphorylation de VanR en réponse à la vancomycine présente dans le milieu externe et intervient ainsi dans le contrôle de la transcription des gènes à résistance à la vancomycine.

Ces séquences de régulation sont notamment capables d'augmenter le niveau de résistance, dans la mesure où elles favorisent l'expression des protéines de résistance comprises dans les polypeptides de l'invention.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les polypeptides de la composition ci-dessus sont codés par la séquence SEQ ID NO 6 identifiée dans la liste des séquences, qui représente la séquence codante des 5 protéines décrites précédemment.

Une autre séquence selon l'invention est désignée par SEQ ID NO 11 qui contient la séquence SEQ ID NO 6 ainsi qu'un enchaînement en amont de SEQ ID NO 6 codant pour une transposase (codée par le brin (-) de la séquence, et un enchaînement en aval de SEQ ID NO 6 correspondant à des gènes vanY et vanZ et à chaque extrémité, des séquences inversées répétées de 38 pb. SEQ ID NO 11 constitue un transposon dont les gènes interviennent à des niveaux différents dans l'établissement de la résistance aux glycopeptides.

L'invention vise également les protéines purifiées appartenant à la composition et aux polypeptides décrits précédemment. En particulier l'invention vise la protéine purifiée VanA, caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence d'acides aminés SEQ ID NO 2 dans la liste des séquences ou une protéine VanC, codée par un gène capable d'hybrider avec le gène vanA.

La protéine VanA comporte 343 acides aminés et a une masse moléculaire calculée de 37400 Da. La protéine VanC comporte 343 acides aminés et a une masse moléculaire calculée de 37504 Da.

D'autres protéines intéressantes dans le cadre de l'invention correspondent aux séquences identifiées par SEQ ID NO 1 (VanH), SEQ ID NO 3 (VanX), SEQ ID NO 4 (VanR), SEQ ID NO 5 (VanS) dans la liste des séquences.

La séquence indentifiée par l'abréviation SEQ ID NO 1 contient la protéine VanH codée par le gène vanH, cette protéine comporte 322 acides aminés et commence par une méthionine. Cette protéine est une enzyme impliquée la synthèse du peptidoglycane et a une masse moléculaire de 35,754 kDa. VanH présente certaines similitudes avec des déhydrogénases qui catalysent l'oxydation dépendante de NAD⁺ des acides 2-hydroxy-

carboxyliques pour former les acides 2-keto-carboxyliques correspondants. En fait la protéine VanH pourrait mettre en oeuvre le NADP⁺ plutôt que le NAD⁺. La protéine VanH contient également plusieurs résidus de sites réactifs qui participent probablement directement dans la liaison du substrat et à la catalyse. VanH serait impliquée dans la synthèse d'un substrat de la ligase VanA. Ce substrat de VanA serait un acide D- α -hydroxy-carboxylique, qui serait condensé par VanA avec la D-alanine à la place d'un acide aminé D, ce qui affecterait la liaison du précurseur du peptidoglycane, avec la vancomycine, par perte d'une liaison hydrogène parce que l'une des liaisons hydrogène formées entre la vancomycine et le N-acétyl-D-Ala-D-Ala est réalisée avec le groupement NH du résidu D-alanine-terminal. Rappelons que "Ala" est l'abréviation de "alanine".

Les inventeurs ont pu mettre en évidence certaines interactions entre les protéines VanA et VanH et ont pu notamment décrire ceci : la nature de la protéine VanA (ligase D-alanine:D-alanine de spécificité altérée pour son substrat) qui a permis la résistance à des glycopeptides implique la biosynthèse d'un nouveau composé différent de D-Ala-D-Ala par VanA, peptide qui peut être incorporé aux peptidoglycans mais n'est pas reconnu par la vancomycine. En particulier l'observation des similitudes entre le produit du gène vanH avec les α -céto-acides réductases D spécifiques a permis de déterminer que ce composé pouvait ne pas être un acide aminé D mais un acide hydroxy D, qui lorsqu'il était lié avec la D-alanine par VanH pouvait générer un nouveau depsipeptide précurseur du peptidoglycane.

L'invention vise aussi toute combinaison de ces différents protéins dans un complexe de résistance,

ainsi que des protéines hybrides comprenant une ou plusieurs des protéines ci-dessus, ou partie de ces protéines, en association avec une séquence d'acides aminés déterminée.

Entrent également dans le cadre de l'invention, les séquences nucléotidiques codant pour l'une des séquences d'acides aminés décrites ci-dessus.

Une séquence particulière est la séquence nucléotidique de 7,3 kb environ, correspondant au fragment de restriction HindIII-EcoRI, tel qu'obtenu à partir du plasmide pIP816 décrit dans la publication de Leclercq et al - 1988, précitée.

Cette séquence de 7,3 kb comprend l'enchaînement nucléotidique codant pour les 3 protéines de résistance et les 2 protéines de régulation dont il est question ci-dessus. Cette séquence codante est incluse dans un fragment interne BglII-XbaI. Elle comprend aussi une partie des séquences codantes de la transposase et de la résolvasse.

L'invention vise aussi tout fragment nucléotidique comprenant le susdit fragment de restriction ainsi que toute partie du fragment HindIII-EcoRI, en particulier le fragment de 3,4 kb environ EcoRI-XbaI codant pour les 3 protéines de résistance ou le fragment de 1,7 kb environ EcoRV-SacII codant pour VanA ou encore le fragment de 3,3 kb environ HindIII-EcoRI codant pour les 2 protéines de régulation VanR et VanS.

Une autre définition d'une séquence nucléotidique de l'invention correspond à un fragment nucléotidique comportant dans l'ordre les sites de restriction suivants, tel qu'obtenu à partir de pIP816 précité :

HindIII, BglII, BglII, EcoRI, BamHI, XbaI, EcoRI

Une autre séquence nucléotidique selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle correspond à

l'enchaînement choisi parmi les séquences identifiées par SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 11 ou SEQ ID NO 22, ou en ce qu'elle comprend cet enchaînement ou toute partie de cet enchaînement, ou encore tout enchaînement ou partie d'enchaînement d'ADN complémentaire ou tout enchaînement d'ARN correspondant à l'un de ces ADN, susceptible,

- soit de constituer une sonde d'hybridation pour la détection d'une résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, en particulier dans des souches de la famille des cocci à Gram-positif,
- soit de coder pour une séquence nécessaire ou associée à l'expression de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine et/ou la teicoplanine, en particulier dans des souches de la famille des cocci à Gram-positif.

La séquence SEQ ID NO 7 code pour les 3 protéines de résistance VanH, VanA et VanX.

La séquence SEQ ID NO 22 et la séquence SEQ ID NO 11 comprennent un transposon représenté à la figure 7a; ce transposon contient les gènes nécessaires à l'expression de la résistance aux glycopeptides, ainsi que les gènes associés à cette résistance impliqués par exemple dans la régulation de l'expression des gènes nécessaires pour obtenir le phénotype de résistance ou impliqués dans la quantité de polypeptide de résistance obtenue.

Une séquence particulière répondant à la définition ci-dessus est l'une des séquences suivantes :

12

V1 : GGX GAA GAT GGX TCX TTX CAA GGX
 G C AG C G
 A

ou

V2 : AAT ACX ATX CCX GGX TTT AC
 C T C
 C

V1 et V2 permettent la constitution de sondes le cas échéant en association avec d'autres nucléotides, selon le degré de spécificité recherché pour détecter vanA et vanC et peuvent aussi être utilisées comme amorces dans des réactions de polymérisation en chaîne.

D'autres enchaînements nucléotidiques préférés sont les enchaînements SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 12(transposase), SEQ ID NO 13(résolvase), SEQ ID NO 14(vanY), SEQ ID NO 15(vanZ), SEQ ID NO 23(vanR), SEQ ID NO 24(vanS) ou d'une variante de l'un de ces enchaînements dès lors qu'elle code pour une protéine ayant des propriétés immunologiques et/ou fonctionnelles similaires à celles des protéines codées par les enchaînements SEQ ID NO 8 SEQ (vanA), ID NO 9 (vanH), SEQ ID NO 10 (vanX), ou SEQ ID NO 21(vanC), SEQ ID NO 12(transposase), SEQ ID NO 13(résolvase), SEQ ID NO 14(vanY), SEQ ID NO 15(vanZ), SEQ ID NO 23(vanR), SEQ ID NO 24(vanS) ou en ce qu'elle permet la détection de souches résistantes à des antibiotiques de la famille des glycopeptides.

Des variantes englobent tous les fragments des séquences ayant les propriétés suivantes.

Ces séquences codent pour les protéines de résistance VanH, VanA et VanX.

La séquence nucléotidique désignée par SEQ ID NO 8 correspond à un fragment d'ADN de 1029 pb situé entre

le codon ATG en position 377 et le codon TGA en position 1406 sur le plasmide pAT214 (Fig. 6).

L'invention vise également une séquence nucléotidique correspondant à l'enchaînement SEQ ID NO 6 correspondant à la séquence codante des 5 protéines (2 protéines de régulation et 3 protéines de résistance), et comprenant également les séquences flanquantes associées à ces séquences codantes, ou comprenant cet enchaînement.

Entre aussi dans le cadre de l'invention une séquence modifiée par rapport à SEQ ID NO 6, caractérisée en ce qu'elle est dépourvue des séquences flanquantes. Ces séquences flanquantes sont les enchaînements représentés dans les pages suivantes et délimitées comme suit:

- enchaînement en amont de la séquence codant pour R: entre les bases 1 et 1476 de la séquence de la figure 5,
- enchaînement entre la séquence codant pour la protéine senseur S et ORF1: entre les bases 3347 et 3500 de la séquence de la figure 5,
- enchaînement en aval de la séquence codante ORF3: entre les bases 6168 et 7227 de la séquence de la figure 5.

La séquence désignée par SEQ ID NO 6 est encore caractérisée par le fragment comportant les sites de restriction dans l'ordre suivant :

BglIII - EcoRI - BamHI - EcoRI

La localisation des protéines de régulation et de résistance est illustrée figure 3.

Les inventeurs ont identifié en amont et en aval des gènes vanR, vanS, vanH, vanA et vanX nécessaires ou associés à l'expression de la résistance à des glycopeptides à un niveau donné, des gènes codant pour

une transposase et une résolvase (en amont du groupe précité) et des gènes vanY et vanZ, en aval de ce groupe. Les gènes de transposase et de résolvase seraient impliqués dans des fonctions de transposition et le gène vanY codant pour une D,D-carboxy peptidase serait impliqué dans le métabolisme du peptidoglycane, et pourrait contribuer à la résistance aux glycopeptides chez E. faecium BM4147 même si vanR, vanS, vanH, vanA et vanX portés par un plasmide à nombre élevé de copies, confèrent seuls une résistance de haut niveau.

Notons que la séquence codante de la transposase est localisée sur le brin (-) de la séquence ID NO 22 qui code pour vanR, vanS, vanH, vanA, vanX, vanY, vanZ et la résolvase.

L'invention vise non seulement les séquences d'ADN identifiées dans la liste des séquences mais aussi les séquences d'ADN complémentaires et les séquences d'ARN correspondantes. L'invention concerne en outre les séquences équivalentes des précédentes, soit en terme d'expression de protéines, de polypeptides ou de leurs fragments décrits plus haut, soit en terme de capacité à détecter, par exemple par les techniques de polymérisation en chaîne, des souches de bactéries à Gram-positif, présentant une résistance aux antibiotiques de la famille des glycopeptides tels que la vancomycine ou la teicoplanine.

Font également partie de l'invention, des séquences recombinantes caractérisées en ce qu'elles comprennent l'une des séquences nucléotidiques ci-dessus.

L'invention concerne aussi un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend l'une des séquences nucléotidiques ci-dessus, en un site non essentiel pour

sa réplication, sous le contrôle d'éléments de régulation susceptibles d'intervenir dans l'expression, de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine ou la teicoplanine, chez un hôte déterminé.

Des vecteurs recombinants particulièrement avantageux pour la mise en oeuvre de l'invention sont les vecteurs suivants : pAT214 contenant le fragment EcoRV-SacII de 1761 bp contenant une séquence nucléotidique codant pour la protéine VanA ; dans ces vecteurs les séquences de l'invention sont avantageusement placées sous le contrôle de promoteurs tels que le promoteur lac.

L'invention vise aussi un hôte cellulaire recombinant comprenant une séquence nucléotidique telle que décrite précédemment ou un vecteur décrit ci-dessus, dans des conditions permettant l'expression de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la résistance à la vancomycine ou/et à la teicoplanine, cet hôte étant par exemple choisi parmi les bactéries, notamment les cocci à Gram-positif.

Pour certaines applications on peut aussi utiliser les levures, les champignons, les cellules d'insectes ou de mammifères.

L'invention vise également une sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est capable d'hybrider avec une séquence décrite précédemment, cette sonde étant le cas échéant marquée. Ces sondes peuvent être ou non, spécifiques des protéines de résistance aux glycopeptides.

Des marqueurs utilisables pour les besoins de l'invention sont les marqueurs radioactifs connus ainsi

que d'autres marqueurs tels que les marqueurs enzymatiques ou des marqueurs chémoluminescents.

Des sondes ainsi marquées peuvent être utilisées dans des tests d'hybridation pour détecter une résistance aux glycopeptides chez des bactéries à Gram-positif. Dans ce cas, on pourra mettre en oeuvre des conditions de faible stringence.

Des sondes nucléotidiques selon l'invention peuvent être caractérisées en ce qu'elles sont spécifiques chez des bactéries à Gram-positif des séquences codant pour une protéine de résistance à des glycopeptides notamment à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces sondes pouvant en outre être universelles parmi ces séquences.

Par ces sondes spécifiques, on entend tout oligonucléotide hybridant avec une séquence nucléotidique codant pour l'une des protéines selon l'invention, telle que décrite dans les pages précédentes, et ne présentant pas de réaction d'hybridation croisée ou d'amplification (PCR) avec des séquences présentes chez l'ensemble des souches sensibles.

Le caractère universel des oligonucléotides utilisables en PCR, est déterminé par leur capacité de promouvoir spécifiquement l'amplification d'une séquence nucléotidique impliquée dans la résistance chez une souche quelconque de bactérie à Gram-positif, résistante aux antibiotiques de la famille des glycopeptides.

La taille des sondes nucléotidiques selon l'invention peut varier en fonction de l'utilisation recherchée. Pour les oligonucléotides utilisables en PCR on aura recours à des fragments de longueur usuelle dans cette technique. Pour réaliser des sondes, on peut

prendre toute partie des séquences de l'invention, par exemple des sondes fragments de 200 nucléotides.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, une sonde nucléotidique est choisie pour sa spécificité vis à vis d'une séquence nucléotidique codant pour une protéine nécessaire à l'expression chez des bactéries à Gram-positif d'un haut niveau de résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, en particulier à la vancomycine et à la teicoplanine.

A titre d'exemple des sondes intéressantes pourront être choisies dans la partie intragénique du gène vanA.

D'autres sondes avantageuses pour la réalisation de l'invention, sont caractérisées par leur caractère universel, selon la définition précédente, mais non spécifique des gènes de résistance. Elles peuvent être utilisées aussi comme amorces de PCR, et sont par exemple :

V1 : GGX GAA GAT GGX TCX TTX CAA GGX

G C AG C G

A

V2 : AAT ACX ATX CCX GGX TTT AC

C T C

C

V1 et V2 hybrident avec vanA et vanC et sont susceptibles de conduire à la détection chez d'autres micro-organismes, de protéines associées à la résistance aux glycopeptides.

D'autres sondes particulières de l'invention ont le caractère spécifique d'une séquence nucléotidique codant pour une protéine nécessaire à l'expression chez des bactéries à Gram-positif d'un bas niveau de résistance à des antibiotiques de la famille des

glycopeptides, en particulier à la vancomycine chez des bactéries à Gram-positif.

On mentionne également que des sondes oligonucléotidiques qui seraient issues de la séquence du gène *vanA* codant pour la protéine VanA peuvent être utilisées pour rechercher indifféremment une résistance de haut niveau ou de bas niveau.

D'une façon particulièrement préférée, on caractérise une sonde de l'invention en ce qu'elle hybride, avec une séquence nucléotidique chromosomique ou non chromosomique d'une souche à Gram-positif résistante à des glycopeptides, notamment la vancomycine et/ou la teicoplanine, en particulier en ce qu'elle hybride avec une séquence nucléotidique chromosomique ou non chromosomique d'une souche de cocci à Gram-positif, par exemple une souche d'entérocoque et de préférence *E. faecium* 4147 ou *E. gallinarum*.

Pour différencier des souches à haut niveau de résistance, de souches à bas niveau de résistance on pourra réaliser un test d'hybridation en mettant en oeuvre des conditions de forte stringence.

Les oligonucléotides de l'invention peuvent être obtenus à partir des séquences de l'invention, par coupure avec des enzymes de restriction, ou par synthèse chimique selon les méthodes classiques.

L'invention vise par ailleurs des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent le ou les polypeptides décrits ci-dessus ou une séquence d'acides aminés décrite ci-dessus.

Ces anticorps peuvent être obtenus selon les méthodes classiques de production d'anticorps. En particulier pour la préparation des anticorps monoclonaux on aura recours à la méthode de Kolher et

Milstein selon laquelle on prépare des anticorps monoclonaux par fusion cellulaire entre des cellules de myélome et des cellules spléniques de souris préalablement immunisées avec un polypeptide ou une composition selon l'invention, conformément au procédé classique.

Les anticorps de l'invention sont avantageusement utilisables pour la détection de la présence de protéines caractéristiques d'une résistance aux glycopeptides, en particulier à la vancomycine et à la teicoplanine.

Des anticorps particulièrement intéressants sont les anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre la protéine VanA ou VanC. De tels anticorps permettent avantageusement de détecter des souches de bactéries, en particulier des cocci à Gram-positif présentant une résistance à haut niveau vis à vis des antibiotiques de la famille des glycopeptides. Le cas échéant, une étape de lyse préalable des cellules de l'échantillon soumis à la détection, est mise en oeuvre préalablement à la mise en contact de l'échantillon avec les anticorps.

Pour réaliser cette détection, on aura avantageusement recours à des anticorps marqués par exemple par une substance radioactive ou autre.

Entrent donc dans le cadre de l'invention, des tests pour la détection chez les bactéries à Gram-positif, d'une résistance aux glycopeptides, notamment des tests mettant en oeuvre les techniques ELISA.

Un kit pour le diagnostic in vitro de la présence de souches à Gram-positif, résistantes aux glycopeptides, en particulier à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier aux cocci à Gram-positif par exemple des entérocoques,

par exemple E. faecium ou E. gallinarum, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des anticorps répondant à la définition ci-dessus, le cas échéant marqués,
- un réactif pour la détection d'une réaction immunologique du type anticorps-antigène,
- le cas échéant des réactifs pour effectuer la lyse de cellules de l'échantillon testé.

Les moyens mis au point par les inventeurs présentent par ailleurs l'avantage tout à fait intéressant d'être adaptés pour la réalisation d'un test ou d'un kit rapide et fiable de détection de souches à Gram-positif, résistantes aux glycopeptides par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Un tel test permet d'améliorer la sensibilité des tests existants qui restent peu fiables et peut permettre dans certains cas la détection de l'ensemble des représentants de la famille des gènes codant pour des protéines de résistance aux glycopeptides chez des bactéries à Gram-positif.

La réalisation d'un test par la méthode d'amplification des gènes de ces protéines est faite par la technique PCR ou par la technique IPCR (IPCR : abréviation de réaction de polymérisation en chaîne inverse).

La technique IPCR permet l'amplification des régions NH₂ et COOH terminales des gènes que l'on souhaite détecter.

Certaines amorces particulières permettent d'amplifier les gènes des souches résistantes à bas niveau. Ces amorces sont par exemple choisies dans la séquence codant pour la protéine de résistance VanA.

A titre d'exemple les séquences suivantes sont utilisables comme amorces pour la préparation de sondes

21

pour la détection d'une amplification par la méthode
PCR ou IPCR.

V1 : GGX GAA GAT GGX TCX TTX CAA GGX

G C AG C G

A

V2 : AAT ACX ATX CCX GGX TTT AC

C T C
 C

X représente l'une des bases A,T,C ou G ou encore correspond dans tous les cas à l'inosine.

L'invention vise naturellement les sondes complémentaires des oligonucléotides précédemment décrits ainsi que éventuellement les sondes ARN qui leur correspondent.

Un kit pour le diagnostic in vitro de la présence de souches de bactéries à Gram-positif, résistantes aux glycopeptides, en particulier résistantes à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier aux cocci à Gram-positif, notamment en ce qu'il s'agit de souches d'entérocoques, par exemple E. faecium ou E. gallinarum, est caractérisé en ce qu'il comprend :

- une sonde nucléotidique répondant aux définitions ci-dessus et le cas échéant,
- des oligonucléosides triphosphates en quantité suffisante pour permettre l'amplification de la séquence recherchée,
- un tampon d'hybridation,
- un agent de polymérisation d'ADN.

L'invention vise aussi un procédé de détection in vitro de la présence de souches à Gram-positif, résistantes aux glycopeptides, en particulier à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier à la famille des cocci à Gram-positif, notamment en ce qu'il s'agit de souches d'entérocoques, par exemple E. faecium ou E. gallinarum, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique susceptible de contenir les souches résistantes,

avec une amorce constituée par une séquence nucléotidique ci-dessus décrite, ou toute partie d'une séquence précédemment décrite, capable d'hybrider, avec une séquence nucléotidique recherchée nécessaire à l'expression de la résistance aux glycopeptides, cette séquence étant utilisée comme matrice, en présence des 4 différents nucléosides triphosphates, et d'un agent de polymérisation, dans des conditions d'hybridation telles que pour chaque séquence nucléotidique ayant hybridé avec une amorce, un produit d'élongation de chaque amorce complémentaire de la matrice est synthétisé,

- b) la séparation de la matrice et du produit d'élongation obtenu, ce dernier pouvant alors également se comporter comme une matrice,
- c) la répétition de l'étape a) de façon à obtenir une quantité détectable des séquences nucléotidiques recherchées,
- d) la détection du produit d'amplification des séquences nucléotidiques.

La détection des produits d'élongation de la séquence recherchée peut être réalisée par une sonde identique aux amorces mises en oeuvre pour effectuer la technique PCR ou IPCR, ou encore par une sonde différente de ces amorces, cette sonde étant le cas échéant marquée.

Des détails concernant la mise en oeuvre des techniques PCR, peuvent être obtenus à partir des demandes de brevets EP 0229701 et EP 0200362.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaissent dans les exemples qui suivent et dans les figures.

F I G U R E S

- Figure 1 : électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) des protéines des fractions membranaires lignes 1 et 4, standards de poids moléculaires ; ligne 2, *E. faecium* BM4147 mis en culture en l'absence de vancomycine; ligne 3, BM4147 mis en culture avec 10 μ g/ml de vancomycine. La tête de flèche indique la position de la protéine VANA.

- Figure 2 :

A : Cartes de restriction des insérats des plasmides pAT213 et pAT214. Le vecteur et l'insérat d'ADN sont distingués par des segments clairs et sombres respectivement. La flèche ouverte représente le gène vanA.

B : Stratégie pour le séquençage nucléotidique pour l'insérat de 1761 bp dans le plasmide pAT214. Les flèches indiquent la direction et l'étendue des réactions de séquençage par la méthode didéoxy. L'amorce synthétique d'oligonucléotides (5' ATGCTCCTGTCTCCTTTC 3' OH) est complémentaire de la séquence entre les positions 361 et 378. Seuls les sites de restriction pertinents sont donnés.

- Figure 3 : position des séquences R,S,ORF1,ORF2,ORF3.

- Figure 4 : représentation de SEQ ID NO 6

- Figure 5 : représentation de SEQ ID NO 6 et de la protéine correspondante.

- Figure 6 : séquence du gène vanA et la protéine correspondante.

- Figure 7 :

(a) : Localisation des gènes *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*, du gène de la transposase et du gène de la résolvasse, ainsi que des séquences terminales inversées répétées de 38 bp à l'extrémité du transposon.

(b) : Cartographie des plasmides (A) Polylinker d pAT29 et des dérivés construits dans cette étude. La flèche marquée P2 indique la position et l'orientation du promoteur P2 de *aphA-3* (Caillaud et al, 1987, Mol. Gen. Genet. 207:509-513). (B) Insérats de pAT80. Les rectangles blancs indiquent l'ADN de pAT29 mais ne sont pas représentés à l'échelle. Les rectangles se terminant par une flèche indiquent les séquences codantes. Les flèches en traits pleins, verticales et horizontales indiquent respectivement la position et l'orientation du gène *aphA-1* dans les dérivés de pAT80. Sites de restriction : Ac, AccI ; B, BamHI ; Bg, BglII ; Bs, BssHII ; E, EcoRI ; H, HindIII ; Hc, HincII ; K, KpnI ; P, PstI ; S, SmaI ; SI, SacI, SII, SacII ; Sa, SalI ; Sp, SphI ; Xb, XbaI. (C) Insérats dans pAT86, pAT87, pAT88 et pAT89. Les insérats sont représentés par des traits pleins et les vecteurs correspondants sont indiqués entre parenthèses.

- Figure 8 : séquence nucléotidique du transposon représenté à la figure 7 et séquence d'acides aminés des protéines correspondantes. La séquence nucléotidique est présentée pour le brin (+) et pour le brin (-) (correspondant à la séquence complémentaire du brin (+) des positions 1 à 3189) sur lequel est localisée la séquence codante de la transposase.

- Figure 9 : séquence nucléotidique du fragment de 1347 bp SacI-PstI du plasmide pAT216 contenant le gène *vanC*. La numérotation commence à la première base G du

site de restriction SacI. La séquence RBS potentielle en amont du codon d'initiation de traduction ATG à la position 215 est soulignée. Le codon STOP (TGA) est indiqué par *. La région codante de vanC et la séquence d'acides aminés déduite sont indiquées en caractères gras. Des clones séquentiels se chevauchant ont été générés par des fragments de restriction de sous-clonage de pAT216 dans le bactériophage M13mp10 (Amersham, Angleterre). L'amorce universelle (New England Biolabs Beverly MA) a été utilisée pour séquencer l'insérat des phages recombinants. Le séquençage a été réalisé par la méthode enzymatique de di-desoxy nucléotide (Sanger et al, 1977 PNAS 74: 5463-5467) en utilisant la polymérase d'ADN T7 (Sequenase US B CORP, Cleveland, OH) et le [α -³⁵S]dATP (Amersham, England). Les produits des réactions ont été chargés sur des gels de polyacrylamide dénaturant à 6%.

- Figure 10 : alignement des séquences d'acides aminés de VanC, VanA, DdlA et DdlB. Les acides aminés identiques (I) et les substitutions conservatives (C) dans les 4 séquences sont indiqués dans l'alignement. Pour classifier les substitutions conservatives, les acides aminés ont été groupés comme suit : RK, LFPMVI, STQNC, AGW, H, ED et Y. Les régions de forte homologie correspondant aux domaines 1, 2, 3 et 4 sont soulignées. Les séquences correspondant aux peptides 1 et 2 sont indiquées par les flèches.

- Figure 11 : description des oligonucléotides V1 et V2 (A) : Séquence d'acides aminés des peptides 1 et 2 de VanA et des D-Ala-D-Ala ligases. Le nombre d'acides aminés entre l'extrémité N-terminale et le peptide 1, entre les peptides 1 et 2 et le peptide 2 et

l'extrémité C-terminale est indiqué. Les acides aminés identiques entre au moins 2 des 3 séquences, sont représentés en caractères gras.

(B) : Peptides cible et séquence nucléotidique déduite. X représente une base quelconque de l'ADN. Le peptide 2 dans DdlB diffère du peptide cible au niveau de 2 positions (*).

(C) : Séquence nucléotidique de V1 et de V2. Des nucléotides alternés et la déoxyinosine (I) qui peuvent correspondre à toute base d'ADN, ont été utilisés aux positions pour lesquelles les séquences nucléotidiques codant pour les peptides cible varient. Les flèches donnent la direction de la synthèse d'ADN. Les oligonucléotides ont été synthétisés par la méthode au méthoxy-phosphoramidite avec un appareil Biosystem ADN 380B (Applied Biosystem, Foster City, Ca). L'ADN a été isolé à partir de lysats bactériens par extraction avec le bromure d'hexadécyl triméthyl ammonium (Inst. Biotechnologies, Inc, New Haven, CO) (Le Bouguénec et al, 1990, J. Bacteriol. 172:727-734) et utilisé comme matrice pour l'amplification par PCR avec un système de chauffage contrôlé "Intelligent Heating Block" IBH101 (Hybarid ltd, GB), selon la description de Mabilat et al (1990, Plasmid 23:27-34). Les produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur gel à 0,8%, après coloration au bromure d'éthidium.

- Figure 12 : inactivation par insertion de vanC. Le gène vanC est représenté par une flèche ouverte et le fragment interne de 690 bp EcoRI-HinCII est hachuré. En trait fin on a représenté l'ADN de pAT114 ; en trait gras l'ADN chromosomique de PM4174 ; les flèches indiquent les gènes de résistance aux antibiotiques : aphA-3 est le gène codant pour la 3'-aminoglycoside

phosphotransférase ; erm est le gène codant pour la ER^R méthyl transférase.

(A) : Le plasmide pAT217 a été construit par ligature du fragment EcoRI-HincII de pAT216 avec le vecteur suicide pAT114 (Trieu-Cuot et al, 1991, Gene 106:21-27) digéré avec EcoRI et SmaI.

(B) : Région vanC de l'ADN chromosomique de BM4174.

(C) : Région vanC après intégration de pAT217.

- Figure 13 : analyse Southern blot de l'intégration de pAT217 dans le gène vanC de BM4174.

(partie gauche) : ADN total de BM4175 (ligne 2) et BM4174 (ligne 3) digéré avec EcoRI et résolu par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. L'ADN du bactériophage lambda digéré avec PstI a été utilisé comme standard de masse moléculaire (ligne 1). L'ADN a été transféré sous vide sur une membrane Nytran (Schleicher et Schül, Allemagne) en utilisant un appareil Trans-Vac TE80 (Höfer Scientific Instruments, San Francisco, CA) et lié à la membrane par l'intermédiaire d'une lumière UV. L'hybridation a été réalisée avec la sonde C (Middle) ou la sonde aphA-3 spécifique de pAT114 (Lambert et al, 1985, Annales de l'Institut Pasteur/Microbiol. 136(b): 135-150).

(partie droite) : les sondes ont été marquées avec le ³²P par translation de coupure. Les masses moléculaires (kb) sont indiquées.

- Figure 14 : alignement des séquences d'acides aminés déduites de VanS à partir de E. faecium BM4147 et de PhoR et EnvZ de E.coli. Les nombres sur la gauche se réfèrent à la position du premier acide aminé dans l'alignement. Les nombres sur la droite se réfèrent à la position du dernier acide aminé de la ligne

correspondante. Les acides aminés identiques sont encadrés. Les pointillés indiquent des trous introduits pour optimiser la similitude. Les traits indiquent les positions des motifs conservés d'acides aminés dans d'autres HPK. Les résidus histidine en gras dans le motif 1 sont des sites potentiels d'autophosphorylation.

- Figure 15 : alignement des séquences d'acides aminés déduites de VanR de E. faecium BM4147, OmpR et PhoB de E.coli ainsi que de CheY de Salmonella typhimurium. Les nombres sur la droite indiquent la position du dernier acide aminé de la ligne correspondante. Les acides aminés indentiques sont encadrés. Les pointillés indiquent les trous introduits pour optimiser les similitudes. Les résidus en caractère gras correspondent aux acides aminés fortement conservés dans les domaines effecteurs, d'autres RR. Le résidu aspartique 57 de CheY est phosphorylé par la HPK associée CheA.

I - IDENTIFICATION DE vanA**Matériels et méthodes pour l'indentification et la caractérisation du gène vanA****Souches bactériennes et plasmides**

L'origine des plasmides utilisés est donnée dans le tableau ci-après.

<u>Souche ou plasmide</u>	<u>Source ou Référence</u>
Escherichia Coli	
JM83	Messing (1979)
AR1062	Rambach et Hogness (1977)
JM103	Hannshan (1983)
ST640	Lugtenberg et van Schijndel van-Dam (1973)
<u>Enterococcus faecium</u>	
BM4147	Leclercq et al (1988)
Plasmide pUC18	Norrande et al (1983)
pAT213	Brisson-Noël et al (1990)
pAT214	Décrit dans ce texte

Préparation des membranes d'enterocoque

Enterococcus faecium BM4147 a été cultivé jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO_{600}) de 0,7 dans 500ml de bouillon coeur-cervelle (milieu broth BHI). L'induction a été réalisée avec 10 μ g/ml de vancomycine (Eli Lilly Indianapolis Ind). Les étapes ultérieures ont été réalisées à 4°C. Les cellules ont été récupérées par centrifugation pendant 10 minutes à 6000g, lavées dans un tampon TE (0,01 M TRIS-HCl, 0,002 M EDTA, pH 7,0) et lysées avec des billes de verre (100

μm de diamètre) dans un appareil Braun pendant 2 minutes. Les débris cellulaires ont été séparés par centrifugation pendant 10 minutes à 6000g. Les membranes ont été collectées par centrifugation pendant 1 heure à 65000g et resuspendues dans 0,5ml de tampon TE.

Préparation des minicellules

Des plasmides ont été introduits par transformation dans la souche E.coli AR1062 préparée sous forme de sac bactérien. Les sacs bactériens ont été récupérés sur des gradients de sucrose et les protéines ont été marquées avec 50 μCi de [^{35}S]L-méthionine (Amersham, Grande-Bretagne) selon la méthode de Rambach et Hogness (1977, P.N.A.S. USA, 74; 5041-5045).

Préparation des fractions membranaires et des fractions cytoplasmiques de E.coli

E.coli JM83 et des souches dérivées ont été mises en culture dans un milieu BHI jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO_{600}) de 0,7, lavées et suspendues dans un tampon TE. La suspension cellulaire a été traitée par ultrasons (phonolysée) pendant 20 secondes avec des doses de 50 W dans un appareil de fragmentation de cellules dans un appareil à ultrasons Branson B7 et les cellules intactes ont été éliminées par centrifugation pendant 10 minutes à 6000g. Le surnageant a été fractionné en fractions membranaire et cytoplasmique par centrifugation pendant 1 heure à 100000g.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE)

Les protéines des fractions bactériennes ont été séparées par SDS-PAGE dans des gels à gradient linéaire de polyacrylamide (7,5% - 15%) (Laemmli 1970, Nature 227 : 680-685). L'électrophorèse a été réalisée pendant 1 heure à 200 V puis 3 heures à 350 V. Les gels ont été colorés avec du bleu de Coomassie. Les protéines des extraits ont été séparées dans des gels de 10% de polyacrylamide et visualisées par autoradiographie.

Purification de la bande protéique et détermination de la séquence N-terminale

Les protéines des fractions membranaires d'une culture induite de E.faecium BM4147 ont été séparées par SDS-PAGE. Le gel a été électrotransféré pendant 1 heure à 200 mA sur une membrane de polyvinylidène difluorure (Immobilon Transfer, Millipore) en utilisant un appareil de transfert (Electrophoresis Unit LKB 2117 Multiphor II) selon les recommandations du fabricant. Les protéines transférées ont été colorées avec le rouge de Ponceau. La portion de membrane portant la protéine intéressante a été coupée, centrée sur un filtre en teflon et placée dans la cartouche du bloc d'un séquenceur (Séquenceur Applied Biosystems modèle 470A). La protéine a été séquencée par la dégradation automatisée de Edman (1967, Eur. J.Biochem 1; 80-81).

Construction de plasmides

Le plasmide pAT213 (Brisson-Noël et al, 1990, Antimicrob Agents chemother, 34; 924-927) consiste en un fragment d'ADN EcoRI de 4,0 kb du plasmide pIP816

d'entérocoque cloné au site EcoRI d'un vecteur navette gram-positif-gram-négatif pAT187 (Trieu-Cuot et al, 1987, FEMS Microbiol Lett 48; 289-294). Pour construire pAT214, le fragment d'ADN de 1761 bp EcoRV-SacII de pAT213 a été purifié, traité avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I de E.coli et ligué à l'ADN de pUC18 préalablement digéré avec SmaI et déphosphorylé (figure 2). Le clonage (Maniatis et al, 1982 Cold Spring Harbor Laboratory Press) a été réalisé avec des endonucléases de restriction (Boehringer Mannheim et Pharmacia) avec la ligase ADN T4 (Pharmacia) et la phosphatase alcaline (Pharmacia) selon les recommandations du fabricant.

Sous-clonage dans M13 et séquence nucléotidique

Les fragments d'ADN de restriction ont été sous-clonés dans le polylinker des formes de répllication des dérivés mp18 et mp19 du bactériophage M13 (Norranders et al, 1983, Gene 26; 101-106), obtenus auprès de Pharmacia P-L Biochemicals. E.coli JM103 a été transfecté avec des phages recombinants et de l'ADN simple brin a été préparé. Le séquençage nucléotidique a été réalisé par la méthode enzymatique des di-desoxy nucléotides (Sanger et al, 1977, P.N.A.S USA 74; 5463-5467) en utilisant une ADN T7 polymérase (Sequenase, United States Biochemical Corporation, Cleveland Ohio) et de l' $[\alpha^{35}\text{S}]\text{dATP}$ (Amersham, Grande-Bretagne). Les produits des réactions ont été révélés dans des gels de polyacrylamide contenant un tampon dénaturant à 6%.

Analyse informatique et données sur la séquence

La séquence d'ADN complète a été assemblée en utilisant les programmes d'ordinateur DBCOMP et DBUTIL (Staden, 1980, Nucleic Acids Res 8; 3673-3694). La banque de données de protéines, PSEQIP de l'Institut Pasteur a été criblée en utilisant un algorithme développé par Claverie (1984, Nucleic Acids Res 12; 397-407). Les alignements entre des paires de séquences d'acides aminés ont été construits en utilisant l'algorithme de Wilbur et al (1983, P.N.A.S USA 80; 726-730). La signification statistique de l'homologie a été évaluée avec l'algorithme de Lipman et Pearson (1985, Science 227; 1435-1440).

Pour chaque comparaison 20 séquences d'acides aminés ont été utilisées pour calculer les moyennes et les déviations standard des résultats aléatoires.

Tests de complémentation génétique

Les plasmides ont été introduits par transformation dans E.coli ST640, un mutant sensible à la température avec une ligase non modifiée D-ala-D-ala (Lugtenberg et al 1973, J. Bacteriol 110; 26-34). Les transformants ont été sélectionnés à 30°C sur des plaques contenant 100 µg/ml d'ampicilline et la présence de l'ADN plasmidique de la taille recherchée et les cartes de restriction ont été vérifiées. Des colonies uniques poussées à 30°C dans un milieu BHI broth contenant de l'ampicilline ont été placées à la fois sur un milieu agar BHI contenant 100 µg/ml d'ampicilline et dans 50 µM d'isopropyle-1-thio-β-D-glacto-pyranoside (IPTG) et les plaques ont été incubées à une température permissive de 30°C ou non permissive de 42°C. Le test de complémentation était

considérer comme positif si les colonies étaient présentes après 18 heures d'incubation à 42°C.

RESULTATS

Identification de la protéine VanA et séquence N-terminale

Les fractions membranaires des E. faecium BM4147 mis en culture d'une part dans des conditions d'induction, et d'autre part en l'absence d'induction, ont été analysées par SDS-PAGE. La seule différence détectable associée avec l'exposition à des concentrations sous-inhibitrices de vancomycine a été l'intensification marquée d'une bande qui correspondait à une protéine de poids moléculaire estimé d'environ 40 kDa. Dans les cellules induites et dans les cellules non induites, la bande protéique représente la même protéine puisque cette bande est absente des membranes d'un dérivé de BM4147 qui a perdu le plasmide pIP816. La protéine inductible, désignée par VanA a été purifiée après SDS-PAGE et une dégradation automatisée de Edman a été réalisée sur un échantillon de 50 pmol. Neuf acides aminés de la séquence N-terminale de VanA ont été identifiés : Met Asn Arg Ile Lys Val Ala Ile Leu.

Sous-clonage du gène vanA

L'insérat de 4,0 kb du plasmide pAT213 porte le déterminant de la résistance aux glycopeptides de E. faecium BM4147. Divers fragments de restriction de cet insérat ont été sous-clonés dans pUC18 et les

plasmides recombinants spécifiques de *vanA* dans *E.coli* ont été identifiés par analyse SDS-PAGE des protéines des fractions cytoplasmique et membranaire ou des extraits de sacs bactériens. Cette approche a été utilisée car *E.coli* est intrinsèquement résistant au glycopeptide. L'insérat EcoRV-SacII du plasmide pAT214 (figure 2) code pour un polypeptide unique de 40 kDa qui migre conjointement avec *VanA*, issu des préparations membranaires de *E. faecium* BM4147.

Séquence nucléotidique de l'insérat dans pAT214 et identification de la séquence codante *vanA*

La séquence nucléotidique de l'insérat EcoRV-SacII de 1761 bp dans pAT214 a été déterminée sur les deux brins de l'ADN selon la stratégie décrite à la figure 2. La localisation des codons de terminaison (TGA, TAA, TAG) dans trois cadres de lecture sur chaque brin d'ADN a montré la présence d'un unique cadre de lecture ouvert (ORF) ayant une taille suffisante pour coder pour la protéine *VanA*. Ce cadre de lecture ORF est localisé entre le codon TAA en position 281 et le codon TAG en position 1406. La séquence d'acides aminés déduite de ORF a été comparée avec celle de l'extrémité N-terminale de *VanA*. Les neuf acides aminés identifiés par le séquençage protéique sont codés par la séquence nucléotidique débutant avec le codon ATG (méthionine) en position 377 (figure 3). Ce codon d'initiation de traduction est précédé par une séquence (TGAAAGGAGA), caractéristique d'un site de liaison au ribosome (RBS) de bactéries à Gram-positif qui est complémentaire pour les 8 bases de l'ARNr de la sous-unité 16S de *Bacillus subtilis* dans sa partie (3'OH UCUUCCUCC 5') (Moran et al, 1982, Mol. Gen. Genet. 186; 339-346). Dans ce cadre

ORF, il n'y a pas d'autr codon d'initiation ATG ou GTG entre les positions 281 et 377. La séquence de 1029 bp qui s'étend du codon ATG en position 377 au codon TGA en position 1406 code pour une protéine contenant 343 résidus d'acides aminés. Le poids moléculaire calculé de cette protéine est 37400 Da ce qui est en accord avec l'estimation de 40 kDa obtenue par l'analyse SDS-PAGE.

Homologie des séquences d'acides aminés de VanA et des enzymes ligases D-ala-D-ala

Le criblage de la banque de données de protéines, PSEQIP a montré l'existence d'une homologie de séquences entre VanA et les ligases D-ala-D-ala de *E.coli* (ECOALA, Robinson et al, 1986, J. Bacteriol 167; 809-817) et de *Salomella typhimurium* (DALIG, Daub et al, 1988, Biochemistry 27; 3701-3708). Le pourcentage de similarité calculé par paires de protéines était compris entre 28% et 36% pour les acides aminés identiques et entre 48% et 55% en tenant compte des acides aminés homologues. VanA et DALIG sont plus étroitement liées. La signification statistique de ces similarités a été évaluée en alignant VANA et des séquences contenant la même composition en acides aminés que DALIG ou ECOALA (Lipman et Pearson, 1985, Science 227; 1435-1440).

Test de complémentation génétique pour l'activité de ligase D-ala-D-ala

La souche *E.coli* ST640 est un mutant thermosensible présentant une activité ligase D-ala-D-ala déficiente (Lugtenberg et al, 1973, J. Bacteriol

113 : 96-104). Les plasmides pUC18 et pAT214 ont été introduits par transformation dans *E.coli* ST640. Les souches ST640 et ST640 (pUC18) ont poussé normalement uniquement à la température permissive (30°C) alors que *E.coli* ST640 (pAT214) a poussé à la fois à la température permissive et à la température non permissive (42°C).

Ce test montre que VANA est fonctionnellement apparentée aux D-Ala-D-Ala ligases dans *E.coli* et est probablement capable de catalyser la même réaction de ligation que DALIG.

II - Système de régulation à deux composants VanS-VanR, pour le contrôle de la synthèse de depsipeptides de précurseur de peptidoglycanes

MATERIELS ET METHODES

Souches, plasmides et conditions de culture

Les fragments de restriction de pIP816 (Tra⁺, Mob⁺, Vm^r) ont été clonés dans des dérivés du vecteur pAT29 qui constitue un vecteur navette entre les bactéries gram-positives et gram-négatives (oriR pAM β 1, oriR pUC, oriT RK2, spc, lacZ α) (Trieu-Cuot et al, 1990, Nucleic Acids Res. 18:4296). Ce vecteur a été construit par les inventeurs et utilisé pour transformer la souche *E.coli* JM103 (Δ (lac-proAB), supE, thi, strA, sbcB15, endA, hspR4, F traD36, proAB, LacI^q, lacZAM15) (Messing et al, 1983, Methods Enzymol. 101:20-78). L'ADN plasmidique a été préparé par un protocole de lyse alcaline à petite échelle (Sambrook et al, 1982, Molecular cloning, a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY) et introduit par électrotransformation (Cruz-Rodz A.L. et al, 1990, Mol. Gen. Genet. 224: 152-154) dans E. faecalis JH2-2 (Fus^R , Rif^R) (Jacob A.E. et al, 1974, J. Bacteriol. 117:360-372), en utilisant un appareil Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie). Les profils de restriction des plasmides purifiés à partir de E. faecalis et de E.coli ont été comparés pour détecter d'éventuels réarrangements d'ADN.

Le plasmide intégratif pAT113 (Mob^+ , Em^R , Km^R , $oriR$ PACYC184, $attTn1545$, $LacZ\alpha$) (Trieu-Cuot et al, Gene 106:21-27) porte les extrémités jointes du transposon Tn1545. Ce vecteur ne se réplique pas dans les bactéries gram-positives mais s'intègre au chromosome de l'hôte par recombinaison illégitime médiée par l'intégrase de Tn1545 ou de Tn916 (Trieu-Cuot et al précité). Les plasmides intégratifs ont été introduits par électrotransformation dans E. faecalis BM4148 (souche JH2-2::Tn916). Cette souche est modifiée par le transposon Tn916 décrit par Franke A.E. et al (1981, J. Bacteriol. 145: 494-502).

Les cultures ont été réalisées dans un bouillon coeur-cervelle (BHI - Brain Heart Infusion Broth) ou sur agar à 37°C. La méthode de Steers et al (Antibiot. Chemother. Basel. 9:307-311) a été utilisée pour déterminer les concentrations minimales d'inhibition (MICs) des antibiotiques sur un milieu gélosé Mueller-Hinton agar.

Techniques d'ADN recombinant

Le clivage de l'ADN avec des endonucléases de restriction (Boehringer Mannheim and Pharmacia), la

purification des fragments d'ADN de restriction à partir des gels d'agarose, la conversion des extrémités cohésives en extrémités franches avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I de E.coli (Boehringer Mannheim), la déphosphorylation des extrémités de l'ADN avec la phosphatase intestinale de veau (Boehringer Mannheim), la ligature des fragments d'ADN avec la T4 DNA ligase (Amersham) ont été réalisés selon les méthodes standard de Sambrook et al (1982, Molecular Cloning, a laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor NY).

Construction de plasmide

L'origine des vecteurs et des insérats utilisés pour les plasmides recombinants construits ici est la suivante :

(i) vecteur pAT78 pour la reconnaissance de promoteur : l'ADN amplifié du gène cat de chloramphénicol acétyltransférase du plasmide pc194 de Staphylococcus aureus (Horinouchi et al, 1982, J. Bacteriol. 150:815-825) a été inséré entre les sites de restriction PstI et SphI du vecteur navette pAT29. L'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne a été effectuée au moyen des amorces A1 et A2 qui ont été synthétisées par la méthode au méthoxy phosphoramidite (Mabilat et al, 1990, Plasmid 23:27-34). La séquence de l'amorce A1 (5'GCTGCAGATAAAAAATTTAGGAGG) est composée d'un site de reconnaissance PstI (souligné) et de 18 bases (positions 6 à 23) de pc194 qui incluent le site de liaison au ribosome (RBS ; AGGAGG positions 18 à 23) du gène cat. La séquence de l'amorce

A2(5'CGCATGCTATTATAAAA GCCAGTC) contient le site de clivage SphI (souligné) et est complémentaire (positions 8 à 24) à 17 bases de l'extrémité 3' du gène cat. Le triplet ATT aux positions 9 à 11 correspond au codon stop TAA de cat. Les fragments d'ADN amplifiés avec les amorces A1 et A2 consistent donc en une phase ouverte de lecture (orf) et en un site de liaison au ribosome pour CAT (positions 1234 à 1912 selon la numérotation de Horinouchi et al (1982, J. Bacteriol. 150:815-825) flanqués par les sites PstI et SphI. La position 1234 est localisée à l'intérieur de la boucle de la structure secondaire de l'ARNm qui bloque la traduction en l'absence de chloramphénicol. Ainsi la séquence amplifiée ne contient pas le promoteur cat ni la séquence complémentaire du RBS qui est essentielle pour la régulation de traduction Ambulos, N.P et al, 1984, Gene 28:171-176).

(ii) vecteur d'expression pAT79 : le fragment de 243 bp ClaI-BssHII portant le promoteur P2 du gène aphA-3 du plasmide d'entérocoque pJH1 (Caillaud et al, 1987, Mol. Gen. Genet. 207: 509-513) a été inséré entre les sites de restriction EcoRI et SacI de pAT78.

(iii) plasmide pAT80 et ses dérivés : le fragment de 5,5 kb BglII-XbaI de pIP816 a été inséré entre les sites BamHI et XbaI de pAT78. Le plasmide résultant dénommé par pAT80 a été partiellement digéré avec HincII et ligaturé avec le fragment EcoRV contenant un gène apparenté au gène apha-I du transposon Tn903 (Oka A. et al, 1981, J. Mol. Biol. 147:217-226). Ce fragment contient le gène

aphA-I qui code pour la 3'aminoglycoside phosphotransférase de type I conférant la résistance à la kanamycine. L'insertion de aphA-I a été réalisée à trois sites différents dans pAT80, générant les plasmides pAT81, pAT83 et pAT85. Les cassettes BamHI et EcoRI contenant aphA-I ont été insérées aux sites BamHI (pour former le plasmide pAT84) et EcoRI (pour former le plasmide pAT82) de pAT80.

(iv) plasmide pAT86, pAT87, pAT88 et pAT89 : le plasmide pAT86 a été construit par clonage du fragment de 2,803 bp, EcoRI-SacII de pAT80 codant pour VanH et VanA, au niveau d'un site SmaI de pAT79. pAT87 a été obtenu en insérant le fragment de 3,4 kb EcoRI-XbaI de pAT80 en amont du gène cat du vecteur de détection de promoteur pAT78. Le plasmide pAT88 résultait de la ligature de pAT78 digéré avec EcoRI et BamHI avec le fragment EcoRI-BamHI de 1,731 bp de pAT80. Le fragment BglIII-AccI (positions 1 à 2356) de pAT80 a été inséré dans le polylinker du vecteur intégratif pAT113, générant pAT89.

Sous-clonage dans M13 et séquençage

Les fragments d'ADN de restriction ont été sous-clonés dans un polylinker de dérivés répliatifs du bactériophage M13, ces dérivés étant appelés mp18 et mp19 (Norrand et al, 1983, Gene 26:101-106). E.coli JM103 a été transfecté avec les phages recombinants et un ADN simple brin a été préparé. Le séquençage des nucléotides a été réalisé selon les conditions décrites par Sanger et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74: 5463-5467) en utilisant la polymérase d'ADN T7 modifiée

(Sequenase, United States, Biochemical Corporation Cliveland OH) et [α -35S]dATP (Amersham). Les produits des réactions ont été résolus sur des gels de gradients dans un tampon de polyacrylamide à 6%.

Test enzymatique

Les dérivés JH2-2 de E. faecalis ont été cultivés à une densité optique OD₆₀₀ de 0,7 dans un milieu BHI broth complété avec de la spectinomycine (300 µg/ml). Les cellules ont été traitées avec une lysozyme, lysée par sonication et les débris cellulaires ont été centrifugés pendant 45 minutes à 100000g selon la description de Courvalin et al (1978, Antimicrob. Agents Chemother. 13:716-725). La formation de 5-thio-2-nitrobenzoate a été mesurée à 37°C en présence et en l'absence de chloramphénicol et l'activité CAT spécifique a été exprimée en micromole par minute et par milligramme de protéines (Shaw et al, 1975, Methods Enzymol. 43:737-755).

RESULTATS

Les gènes vanH et vanA de pIP816 ont été clonés dans un plasmide pAT79 sous le contrôle du promoteur hétérologue P2 (Caillaud et al, 1987, Mol. Gen. Genet. 207:509-513) et le plasmide pAT86 formé ne conférerait pas à la souche E. faecalis JH2-2 la résistance à la vancomycine. Ces gènes ne sont donc pas suffisants pour la synthèse de peptidoglycane en l'absence de l'antibiotique. Différents fragments de restriction de pIP816 ont été clonés dans le vecteur pAT78. Le fragment BglIII-XbaI de 5,5 kb de pAT80 est le plus

petit fragment obtenu qui conférerait la résistance à la vancomycine.

Séquence nucléotidique des gènes vanR et vanS

La séquence de l'insérat dans pAT80 a été déterminée sur les deux brins de l'ADN à partir du site BglII jusqu'au codon d'initiation de traduction ATG de VanH. Deux phases ouvertes de lecture (orf) ont été mises en évidence à l'intérieur de la séquence de 2475 bp : la première phase ouverte de lecture s'étend du nucléotide 386 au nucléotide 1123 ; en position 431 on trouve une séquence caractéristique des séquences RBS de bactéries gram-positives, 6 paires de base en amont du codon d'initiation de traduction ATG (TGAAAGGGTG) ; les autres codons d'initiation de traduction dans cette orf ne sont pas précédés de ce type de séquence. La séquence de 693 bp à partir du codon ATG au niveau 431 jusqu'au codon TAA à la position 1124 est susceptible de coder pour une protéine de 231 acides aminés avec une masse moléculaire de 26,612 Da et qui est désignée par VanR.

Pour la deuxième phase ouverte de lecture (du nucléotide 1089 au nucléotide 2255) la séquence d'acides aminés déduite à partir du premier codon d'initiation en phase (TTG en position 1104) coderait pour une protéine de 384 acides aminés ayant une masse moléculaire de 43,847 Da et désignée par VanS. Les codons TTG en position 1116 et ATG en position 1164 sont des codons d'initiation de traduction en phase précédée par des séquences avec une faible complémentarité avec la terminaison 3'OH de la sous-unité 16S de l'ARN de B. subtilis (GGGGGTTGG-N8-TTG et AGAACGAAAA-N6-ATG respectivement).

Entre le dernier codon de vanS et le codon d'initiation de traduction ATG de vanH on remarque une séquence de 217 bp qui contient une séquence inversée répétée de 17 bp. Cette séquence ne fonctionne pas comme un terminateur de transcription fort.

La comparaison des séquences obtenues avec des bases de données a montré que les motifs d'acides aminés conservés identifiés par Stock et al (1989, Microbiol. Rev. 53:450-490) dans le domaine kinase de 16 HPK (Histidine Protein Kinase) étaient détectés dans la partie C-terminale de VanS. VanS présente deux groupes d'acides aminés hydrophobes dans la région N-terminale. Le résidu Histidine 164 de VanS est aligné avec le résidu His216 de PhoR (Makino et al, 1986, J. Mol. Biol. 192:549-556) et His 243 de EnvZ (Comeau et al, 1985, 164:578-584) qui sont des sites présumés d'autophosphorylation chez ces protéines.

De même les acides aminés 1 à 122 de VanR présentent des similitudes avec les domaines effecteurs de régulateurs de réponse RR (Response Regulators). L'acide aspartique 53 de VanR pourrait être un site de phosphorylation puisque ce résidu est aligné avec Asp 57 de Che Y qui est phosphorylé par HPK associé à CheA et correspond à une position invariante dans d'autres protéines de type RR (Stock et al précité). VanR pourrait appartenir à la sous-classe OmpR-PhoB de RR qui active l'initiation de transcription médiée par l'ARN polymérase comportant le facteur $\sigma 70S$ de E.coli (Stock et al précité).

Inactivation par insertion des gènes van

Des cassettes de résistance à la kanamycine insérées dans le groupe de gènes van, dans le plasmide pAT80 ont montré ceci : l'insertion dans vanR supprime la résistance à la vancomycine et au chloramphénicol ; VanR est un activateur de transcription nécessaire pour l'expression des gènes de résistance à la vancomycine. L'inactivation de vanS conduit à une réduction de deux fois la concentration minimale inhibitrice (MIC) de chloramphénicol et à une réduction de trois fois de l'activité CAT spécifique mais la concentration minimale inhibitrice de vancomycine reste inchangée. Donc VanS est nécessaire pour obtenir un fort niveau de transcription des gènes de résistance à la vancomycine bien qu'il ne soit pas requis pour l'expression du phénotype de résistance à la vancomycine.

Des dérivés de pAT80 portant des insertions dans vanH (pAT83), vanA (pAT84) ou dans la région de 1,0 kb en aval de vanA (pAT85), ont permis d'obtenir une résistance au chloramphénicol mais pas à la vancomycine. Ce phénotype dissocié correspond à l'inactivation de gènes codant pour des enzymes qui synthétisent les précurseurs depsipeptidiques nécessaires pour l'assemblage des parois bactériennes en présence de vancomycine.

En aval du gène vanA, on a mis en évidence au niveau d'une séquence de 365 bp après le codon TGA de vanA et avant le site SacII, la présence d'un orf inactivé dans pAT85 et qui contient un codon d'initiation ATG en phase, précédé d'une séquence RBS-like. Cette séquence code pour une protéine nécessaire

à la résistance au glycopeptide, d'signé par VanX et qui comprend au maximum 330 acides aminés environ.

Trans-activation de la transcription des gènes van

Le plasmide intégratif pAT89 codant pour VanR et Vans a été introduit dans le chromosome de E. faecalis BM4138. Le plasmide pAT87 portant les gènes vanH, vanA et vanX clonés en amont du gène cat dépourvu de promoteur de pAT78, a conféré la résistance à la vancomycine à cette souche mais pas à E. faecalis JH2-2. Le niveau d'expression du gène cat de pAT87 dans les souches BM4138::pAT89 et JH2-2 a indiqué que VanR active la transcription du gène reporteur localisé à l'extrémité 3' du groupe de gènes van. Des niveaux similaires de synthèse CAT ont été observés pour pAT88 qui porte une fusion de transcription entre les parties 5' de vanA et le gène cat. Ces résultats montrent que dans E. faecalis BM4138::pAT89 (pAT87) VanR et Vans codés par le chromosome activent en trans la transcription de vanA, vanH et vanX de pAT87 permettant l'obtention d'une résistance à la vancomycine.

On a par ailleurs remarqué que l'expression du gène était essentiellement constitutive lorsque vanR et vans étaient portés par un plasmide multicopie pAT80 et faiblement inductible par la vancomycine lorsque les gènes pour les protéines de régulation étaient présents sur le chromosome de l'hôte.

III- Caractérisation d la séquence du gène vanc d'Ent rococcus gallinarum BM4174

Définition et utilisation d'amorces universelles pour l'amplification de gènes codant pour des ligases D-Ala-D-Ala et des protéines apparentées impliquées dans la résistance à la vancomycine

La protéine VanaA nécessaire à l'expression d'un haut niveau de résistance aux glycopeptides dans E. faecium BM4147 partage environ 28 à 36% de similitude en acides aminés avec les ligases D-Ala-D-Ala de E.coli mais possède une spécificité de substrats différente de celle de ces ligases. Des peptides désignés par 1 et 2 qui sont conservés dans les séquences des ligases DdlA et DdlB (Zawadzke, 1991 Biochemistry 30:1673-1682) de E.coli et dans la protéine VanaA ont été sélectionnés pour synthétiser les amorces universelles destinées à amplifier des fragments internes de gènes codant pour des D-Ala-D-Ala ligases ou enzymes apparentées. Les peptides cibles GEDG(S/T) (I/L)QG et NT(I/L)PGFT ont été traduits en retour comme le montre la figure IV.1, pour obtenir des oligonucléotides dégénérés V1 et V2. Comme les peptides 1 et 2 de VanaA, DdlA et DdlB sont séparés par des séquences d'acides aminés de longueur similaire, la taille prédite pour le produit d'amplification était d'environ 640 bp.

Une amplification par PCR avec l'ADN de E.coli JM83 et de E. faecium BM4147 a conduit à amplifier des produits correspondant à la taille attendue, qui ont ensuite été purifiés et clonés dans le bactériophage M13mp10 (Norrande et al, 1983, Gene 26:101-106). Le séquençage de l'insérat obtenu avec E.coli JM83 a

indiqué que le produit de PCR était un fragment interne de *ddlA*. Une sonde générée à partir d'un phage recombinant obtenu avec le fragment d'amplification de BM4147 a été utilisée pour l'analyse Southern d'un ADN de BM4147 et de BM4147-1 qui est un dérivé de BM4147 sensible à la vancomycine et qui est dépourvu du plasmide pIP816 (Leclercq et al, 1988, N. Engl. J. Med. 319:157-161). La sonde hybridait avec le fragment d'ADN *EcoRI* de 4 kb de BM4147 mais pas avec l'ADN de *E. faecium* BM4147-1. Comme le gène *vanA* est porté par le fragment *EcoRI* de 4 kb de pIP816, ces résultats indiquent que les amorces permettent également l'amplification d'une partie de *vanA*. Ainsi les oligonucléotides V1 et V2 peuvent amplifier des fragments de gènes codant pour des différentes protéines apparentées aux D-Ala-D-Ala ligases, et ce dans des espèces différentes.

Amplification, clonage et séquençage du gène *vanC*

Une amplification par PCR a été réalisée sur l'ADN total de *E. gallinarum* BM4174 et le produit d'amplification obtenu, d'environ 640 bp a été cloné dans le bactériophage M13mp10. L'ADN simple brin isolé à partir du phage recombinant a été utilisé pour construire une sonde C (Hu et al, 1982, Gene 17:2171-2177). En analyse Southern la sonde hybridait avec un fragment *PstI* de 1,7 kb de BM4174 mais pas avec l'ADN de BM4147 et BM4147-1.

L'ADN de BM4174 a été digéré avec *PstI* et des fragments de 1,5 et 2 kb ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose et clonés dans pUC18 (Norlander et al, 1983, précité). Les plasmides recombinants ont été introduits dans *E. coli* JM83 par

transformation et criblés par hybridation sur colonies (Sambrook et al, 1989, Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) en utilisant la sonde C. Une homologie a été détectée avec un transformant hébergeant un plasmide, appelé pAT216, qui contenait un insérat PstI de 1,7 kb. La séquence de la partie de 1347 bp SacI-PstI de l'insérat de pAT216 a été mise en évidence sur les deux brins d'ADN. La localisation des codons de terminaison dans les trois cadres de lecture de chaque brin d'ADN a révélé la présence d'une phase ORF localisée entre les codons TGA aux positions 47 et 1244. Le codon d'initiation de transcription ATG en position 215 est précédé par une séquence GAAAGGAAGA caractéristique des séquences RBS complémentaire de l'ARN de la sous-unité 16S de B. subtilis (Moran et al, 1982, Mol. Gen. Genet. 186:339-346). La séquence de 1029 bp qui s'étend du codon ATG en position 215 au codon TGA en position 1244 pourrait coder une protéine de 343 acides aminés ayant une masse moléculaire calculée de 37504Da désignée par VanC. Une similitude de séquence a été détectée entre VanC, VanA et les ligases D-Ala-D-Ala de E.coli. En particulier quatre domaines de forte homologie préalablement trouvés entre VanA et les D-Ala-D-Ala ligases d'entérobactéries sont également présents dans VanC. Le pourcentage d'acides aminés identiques calculé pour ces protéines prises deux à deux était entre 29 et 38%. L'alignement des quatre séquences a révélé la présence de 57 acides aminés invariants qui incluent les résidus conservés des peptides 1 et 2 utilisés pour définir les sondes oligonucléotidiques V1 et V2.

Inactivation par insertion du gène vanC

Pour évaluer la contribution de vanC à la résistance à la vancomycine chez E. gallinarum BM4174, le gène vanC a été inactivé par insertion. Un fragment de 690 bp EcoRI-HincII, interne à vanC a été cloné dans pAT114 qui ne se réplique pas dans les bactéries gram-positives. Le plasmide pAT217 résultant a été introduit dans BM4174 par électrotransformation (Cruz-Rodz et al, 1990, Mol. Gen. Genet. 224:152-154) et les clones supposés résulter d'une recombinaison homologue conduisant à l'intégration de pAT217 dans vanC ont été sélectionnés sur de l'érythromycine. Le clone BM4175 a été comparé à BM4174 par hybridation Southern en utilisant la sonde C et aphA-3 spécifique de pAT114. Les deux sondes hybridait avec le fragment EcoRI de 8,6 kb de BM4175. La sonde C hybridait avec un fragment de 2,5 kb de BM4174 alors qu'aucun signal n'était observé avec la sonde aphA-3. Les résultats indiquent que le plasmide pAT217 de 6,1 kb était intégré dans le gène vanC. La détermination de la concentration minimum inhibitrice de vancomycine pour BM4174 (16 mg/l) et BM4175 (2 mg/l) a indiqué que l'inactivation par insertion dans vanC abolit la résistance à la vancomycine.

VanC est donc requise pour la résistance à la vancomycine. On peut donc penser que cette protéine synthétise un dipeptide ou un depsipeptide qui est incorporé dans les précurseurs de peptidoglycanes et n'est pas reconnu par la vancomycine.

Les séquences qui font l'objet de l'invention sont données dans les pages suivantes après la liste des séquences contenant la description de ces séquences.

Dans la liste des séquences, les protéines sont repérées par rapport à la position des bases nucléotidiques correspondant aux acides aminés des extrémités des protéines.

List d s s'qu nc s

(contenues dans les séquences I (Ia, Ib), II présentées ci-après ou dans la séquence de la figure 5).

Séquences d'acides aminés

SEQ ID NO 1 (VanH) : séquence de la première protéine de résistance, correspondant à la séquence d'acides aminés de la phase de lecture ouverte n° 3, commençant à la base 3501 et se terminant à la base 4529, contenant la séquence codante du gène vanH entre les bases 3564 et 4529, par rapport à la séquence de la figure 5 ou correspondant à la séquence entre les positions des nucléotides 6018 et 6983 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 2 (VanA) : séquence de la protéine VanA, correspondant à la séquence d'acides aminés de la phase de lecture ouverte n°1, commençant à la base 4429 et se terminant à la base 5553, par rapport à la séquence de la figure 5 ou correspondant à la séquence entre les positions des nucléotides 6977 et 7807 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 3 (VanX) : séquence de la troisième protéine de résistance, correspondant à la séquence d'acides aminés de la phase de lecture ouverte n° 3, commençant à la base 5526 et se terminant à la base 6167, par rapport à la séquence de la figure 5 ou correspondant à la séquence entre les positions des nucléotides 7816 et 8621 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 4 (VanR) : séquence de la protéine de régulation R, correspondant à la séquence d'acides aminés de la phase de lecture n°1, commençant à la base

1477 et se terminant à la base 2214, par rapport à la séquence de la figure 5 ou correspondant à la séquence entre les positions des nucléotides 3976 et 4668 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 5 (VanS) : séquence de la protéine senseur S, correspondant à la séquence d'acides aminés de la phase de lecture ouverte n°2, commençant à la base 2180 et se terminant à la base 3346, par rapport à la séquence de la figure 5 ou correspondant à la séquence entre les positions des nucléotides 4648 et 5800 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 16 : séquence de la transposase correspondant aux acides aminés compris entre les nucléotides 150 et 3112 de la séquence Ib.

SEQ ID NO 17 : séquence de la résolvasse comprenant les acides aminés situés entre les positions de nucléotides 3187 et 3759 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 18 : séquence VanY comprenant les acides aminés situés entre les positions des nucléotides 9046 à 9960 dans la séquence Ia.

SEQ ID NO 19 : séquence VanZ comprenant les acides aminés situés entre les positions des nucléotides 10116 et 10598 dans la séquence Ia.

SEQ ID NO 20 : séquence VanC d'acides aminés représentée sur la liste II.

- Séquences nucléotidiques

SEQ ID NO 6 : séquence nucléotidique contenant la séquence codant pour les 5 protéines, ainsi que les séquences flanquantes, représentée à la figure 5.

SEQ ID NO 7 : séquence contenant la séquence codant pour les 3 protéines de résistance, ainsi que les séquences flanquantes et commençant à la base 3501 et se terminant à la base 6167, représentée à la figure 5.

SEQ ID NO 8 : séquence du gène van A, commençant à la base 4429 et se terminant à la base 5553, de la séquence présentée à la figure 5, ou correspondant à la séquence nucléotidique située entre les nucléotides 6977 et 7807 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 9 : séquence codant pour la première protéine de résistance appelée VanH, commençant à la base 3501 et se terminant à la base 4529, en particulier la séquence vanH dont la séquence codante est localisée entre les bases 3564 et 4529, de la séquence présentée à la figure 5, ou correspondant à la séquence nucléotidique située entre les nucléotides 6018 et 6983 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 10 : séquence codant pour la troisième protéine de résistance VanX, commençant à la base 5526 et se terminant à la base 6167, de la séquence présentée à la figure 5, ou correspondant à la séquence nucléotidique située entre les nucléotides 7816 et 8621 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 11 : séquence du transposon codant pour la transposase, la résolvasse, VanR, VanS, VanH, VanA, VanX, VanY et VanZ et contenant la séquence inversée

répétée de 38 pb à ses extrémités N- et C-terminales, et correspondant à la séquence Ia.

SEQ ID NO 12 : séquence codant pour la transposase, commençant à la base 150 et se terminant à la base 3112 de la séquence Ib.

SEQ ID NO 13 : séquence codant pour la résolvasse, commençant à la base 3187 et se terminant à la base 3759 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 14 : séquence codant pour VanY commençant à la base 9046 et se terminant à la base 9960 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 15 : séquence codant pour VanZ commençant à la base 10116 et se terminant à la base 10598 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 21 : séquence codant pour VanC, représentée sur la liste II en correspondance avec la protéine VanC.

SEQ ID NO 22 : séquence complète Ia du transposon de E. faecium commençant à la base 1 et se terminant à la base 10851.

SEQ ID NO 23 : séquence codant pour la protéine VanR, commençant à la base 3976 et se terminant à la base 4668 de la séquence Ia.

SEQ ID NO 24 : séquence codant pour la protéine VanS, commençant à la base 4648 et se terminant à la base 5800 de la séquence Ia.

I. Séquence nucléotidique du transposon et traduction.

Ia. brin "+"

1 GGG GTA GCG TCA GGA AAA TGC GGA TTT ACA ACG CTA AGC CTA TTT TCC TGA CGA ATC CCT
 61 CGT TTT TAA CAA CGT TAA GAA AGT TTT AGT GGT CTT AAA GAA TTT AAT GAG ACT ACT TTC
 121 TCT GAG TTA AAA TGG TAT TCT CCT AGT AAA TTA ATA TGT TCC CAA CCT AAG GGC GAC ATA
 181 TGG TGT AAC AAA TCT TCA TTA AAG CTA CCT GTC CGT TTT TTA TAT TCA ACT GCT GTT GTT
 241 AGG TGG AGA GTA TTC CAA ATA CTT ATA GCA TTG ATA ATT ATG TTT AAA GCA CTG GCT CTT
 301 TGC AAT TGA TGC TGT ATG GTG CGT TCT CTA AGC TCA CCT TGT TTT CCG AAG AAA ATA GCT
 361 CTT GCC AAT CCA TTC ATG GCT TCT CCT TTA TTC AAT CCT CTT TGT ATT TTT CTT CTT AAT
 421 GAT TCA TCC GAT ATA TAA TTC AAA ATA AAG ATC GTT TTT TCT ATT CGG CCC ATC TCA CGT
 481 AAG GCT GTA GCT AAG CTG TTT TGT CTT GAA TAG GAA CCT AGC TTC CCC ATA ATA AGG GAT
 541 GCT GAA ACT GTT CCC TCC CTT ATA GAA TGA GCT AAT CGC AAA ACA TCC TCA TAA TTT TCT
 601 TTA ATG ACC TTT GTA TTT ATT TGT CCA CGT AAA ATG GCT TCT AGT TTT GGA TAC TCA CTT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

661 GCT TTA TCT ATC GTA AAT AAT TTT GAG TCC GAT AAA TCC CTT ATT CTT GGG GCA AAT TTA
721 AAT CCT AAT AAA TGA GTC AGT CCG AAT ATT TGG TCA GTG TAA CCG GCA GTG TCT GTA TAA
781 TGT TCC TCT ATG TTT AGA TCC GTC TCA TGA TGT AAC AAA CCA TCC AAA ACA TGA ATC GCA
841 TCT GAA TTA GTA TGA ATA ATC TTT GTG TAG TAA GAA GAG AAT TGA TCA CTT GTA AAT
901 CGG TAG ATG GTG GCT CCT TTT CCA GTT CCA TAA TGT GGA TTT GCA TCT GCA TGT AGT GAT
961 GAA ACA CCT AGC TGC ATT CTC ATA CCA TCT GAC GAA GAT GTT GTA CCG TCG CCC CAA TAG
1021 AAA GGC AAT TGT AAT TTA TGA TGA AAG TTT ACT AAT ATG GCT TGG GCT TTA TTC ATG GCA
1081 TCT TCA TAC ATG CGC CAT TGA GAT ACA TTG GCT AGT TGC TTA TAT GTA AGT CCG GGT GTG
1141 GCT TCG GCC ATC TTG CTC AAG CCA ATA TTC ATT CCC ATT CCT AAA AGG GCA GCC ATG ATA
1201 ATG ATT GTT TCT TCC TTA TCT GGT TTT CGA TTA TTG GAA GCA TGA GTG AAT TGC TCA TGA
1261 AAT CCT GTT ATA TGG GCC ACA TCC ATG AGT AAA TCA GTT AAT TTT ATT CTT GGT AGC ATC
1321 TGA TAA AGG CTT GCA CTA AAT TTT TTT GCT TCT TCT GGA ACA TCT TTT TCT AAG CGT GCA
1381 AGT GAT AGC TTT CCT TTT TCA AGA GAA ACC CCA TCT AAC TTA TTG GAA TTG GCA GCT AAC
1441 CAC TTT AAC CTT TCA TTA AAG CTG GTT CTC TCC TCC GTT ATA TAA TCT TCG AAT GAT AAA

58

FEUILLE DE REMPLACEMENT

1501 CTA ACT GAT AAT CTC GTA TTC CCC TTC GAT TGA TTC CAT GTA TCT TCC GAA AAC AAA TAT
1561 TCC TCA AAA TCC CTA TAT TGT CTG CCA ACA ATG GAA ACA TCT CCT GCC CGA ACA TGC
1621 TCC CGA AGT TCT GTT AAA ACA GCC ATT TCA TAG TAA TGA CGA TTA ATT GTT GTA CCA TCA
1681 TCC TCG TAT AAA TGT CTT TTC CAT CGT TTT GAA ATA AAA TCC ACA GGT GAG TCA TCA GGC
1741 ACT TTT CGC TTT CCA GAT TCG TTC ATT CCT CGG ATA ATC TCA ACA GCT TGT AAA AGT GGC
1801 TCA TTT GCC TTT GTA GAA TGA AAT TCC AAT ACT CTT AAT AGC GTT GGC GTA TAT TTT CTT
1861 AGT GAA TAA AAC CGT TTT TGC AGT AAG TCT AAA TAA TCA TAG TCG GCA GGA CGT GCA AGT
1921 TCC TGA GCC TCT TCT ACT GAA GAG ACA AAG GTA TTC CAT TCA ATA ACC GAT TCT AAA ACC
1981 TTA AAA ACG TCT AAT TTT TCC TCT CTT GCT TTA ATT AAT GCT TGT CCG ATG TTC GTA AAG
2041 TGT ATA ACT TTC TCA TTT AGC TTT TTA CCG TTT TGT TTC TGG ATT TCC TCT TGA GCC TTA
2101 CGA CCT TTT GAT AAC AAA CTA AGT ATT TGC CTA TCA TGA ATT TCA AAC GCT TTA TCC GTT
2161 AGC TCC TGA GTA AGT TGT AAT AAA TAG ATG GTT AAT ATC GAA TAA CGT TTA TTT TCT TGA
2221 AAG TCA CGG AAT GCA TAC GGC TCG TAT CTT GAG CCT AAG CGA GAC AGC TGC AAC AGG CGG
2281 TTA CGG TGC AAA TGA CTA ATT TGC ACT GTT TCT AAA TCC ATT CCT CGT ATG TAT TCG AGT
2341 CGT TCT ATT ATT TTT AGA AAA GTT TCG GGT GAA GGA TGA CCC GGT GGC TCT TTT AAC CAA

2401 CCC AAT ATC GTT TTA TTG GAT TCG GAT GGA TGC TGC GAG GTA ATA ATC CCT TCA AGC TTT
2461 TCT TTT TGC TCA TTT GTT AGA GAT TTA CTA ACC GTA TTA AAT AGC TTC TTT TCA GCC ATT
2521 GCC CTT GCT TCC CAC ACC ATT CTT TCA AGT GTA GTG ATA GCA GGC AGT ATA ATT TTG TTT
2581 TTT CTT AGA AAA TCT ATG CAT TCA TGC AGT AGA TGA ATG GCA TCA CCA TTT TCC AAA GCT
2641 AAT TGA TGA AGG TAC TTA AAT GTC ATT CGA TAT TCA CTC AGG GTA AAA GTT ACA AAG TCG
2701 TAT TCA CTT CGA ATT TCT TTC AAA TGA TCC CAA AGT GTA TTT TCC CTT TGA GGA TAA TGA
2761 TCA AGC GAG GAT GGA CTA ACA CCA ATC TGT TTC GAT ATA TAT TGT ATG ACC GAA TCT GGG
2821 ATG CTT TTG ATA TGA GTG TAT GGC CAA CCG GGA TAC CGA AGA ACA GCT AAT TGA ACA GCA
2881 AAT CCT AAA CGG TTT TCT TCC CTC CTT CGC TTA TTA ACT ATT TCT AAA TCC CGT TTG GAA
2941 AAA GTG AAG TAG GTC CCC AGT ATC CAT TCA TCT TCA GGG ATT TGC ATA AAA GCC TGT CTC
3001 TGT TCC GGT GTA AGC AAT TCT CTA CCT CTC GCA ATT TTC ATT CAG TAT CAT TCC ATT TCT
3061 GTA TTT TCA ATT TAT TAG TTC AAT TAT ATA TCA ATA GAG TGT ACT CTA TTG ATA CAA ATG
3121 TAG TAG ACT GAT AAA ATC ATA GTT AAG AGC GTC TCA TAA GAC TTG TCT CAA AAA TGA GGT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3181 **résolvase**
 LEU ARG LYS ILE GLY TYR ILE ARG VAL SER SER THR ASN GLN ASN PRO SER ARG
 GAT ATT TTG CCG AAA ATC GGT TAT ATT CGT GTC AGT TCG ACT AAC CAG AAT CCT TCA AGA
 3241
 GLN PHE GLN GLN LEU ASN GLU ILE GLY MET ASP ILE ILE TYR GLU GLU LYS VAL SER GLY
 CAA TTT CAG CAG TTG AAC GAG ATC GGA ATG GAT ATT ATA TAT GAA GAG AAA GTT TCA GGA
 3301
 ALA THR LYS ASP ARG GLU GLN LEU GLN LYS VAL LEU ASP ASP LEU GLN GLU ASP ASP ILE
 GCA ACA AAG GAT CGC GAG CAA CTT CAA AAA GTG TTA GAC GAT TTA CAG GAA GAT GAC ATC
 3361
 ILE TYR VAL THR ASP LEU THR ARG ILE THR ARG SER THR GLN ASP LEU PHE GLU LEU ILE
 ATT TAT GTT ACA GAC TTA ACT CGA ATC ACT CGT AGT ACA CAA GAT CTA TTT GAA TTA ATC
 3421
 ASP ASN ILE ARG ASP LYS LYS ALA SER LEU LYS SER LEU LYS ASP THR TRP LEU ASP LEU
 GAT AAC ATA CGA GAT AAA AAG GCA AGT TTA AAA TCA CTA AAA GAT ACA TGG CTT GAT TTA
 3481
 SER GLU ASP ASN PRO TYR SER GLN PHE LEU ILE THR VAL MET ALA GLY VAL ASN GLN LEU
 TCA GAA GAT AAT CCA TAC AGC CAA TTC TTA ATT ACT GTA ATG GCT GGT GTT AAC CAA TTA
 3541
 GLU ARG ASP LEU ILE ARG MET ARG GLN ARG GLU GLY ILE GLU LEU ALA LYS LYS GLU GLY
 GAG CGA GAT CTT ATT CGG ATG AGA CAA CGT GAA GGG ATT GAA TTG GCT AAG AAA GAA GGA
 3601
 LYS PHE LYS GLY ARG LEU LYS LYS TYR HIS LYS ASN HIS ALA GLY MET ASN TYR ALA VAL
 AAG TTT AAA GGT CGA TTA AAG AAG TAT CAT AAA AAT CAC GCA GGA ATG AAT TAT GCG GTA
 3661
 LYS LEU TYR LYS GLU GLY ASN MET THR VAL ASN GLN ILE CYS GLU ILE THR ASN VAL SER
 AAG CTA TAT AAA GAA GGA AAT ATG ACT GTA AAT CAA ATT TGT GAA ATT ACT AAT GTA TCT
 3721
 ARG ALA SER LEU TYR ARG LYS LEU SER GLU VAL ASN ASN
 AGG GCT TCA TTA TAC AGG AAA TTA TCA GAA GTG AAT AAT TAG CCA TTC TGT ATT CCG CTA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3781

ATG GGC AAT ATT TTT AAA GAA AAG GAA ACT ATA AAA TAT TAA CAG CCT CCT AGC GAT

3841

GCC GAA AAG CCC TTT GAT AAA AGA ATC ATC TTA AGA AAT TCT TAG TCA TTT ATT

3901

ATG TAA ATG CTT ATA AAT TCG GCC CTA TAA TCT GAT AAA TTA AGG GCA AAC TTA TGT

3961

VanR MET SER ASP LYS ILE LEU ILE VAL ASP ASP GLU HIS GLU ILE ALA
GAA AGG GTG ATA ACT ATG AGC GAT AAA ATA CTT ATT GTG GAT GAT GAA CAT GAA ATT GCC

4021

ASP LEU VAL GLU LEU TYR LEU LYS ASN GLU ASN TYR THR VAL PHE LYS TYR TYR THR ALA
GAT TTG GTT GAA TTA TAC TTA AAA AAC GAG AAT TAT ACG GTT TTC AAA TAC TAT ACC GCC

4081

LYS GLU ALA LEU GLU CYS ILE ASP LYS SER GLU ILE ASP LEU ALA ILE LEU ASP ILE MET
AAA GAA GCA TTG GAA TGT ATA GAC AAG TCT GAG ATT GAC CTT GCC ATA TTG GAC ATC ATG

4141

LEU PRO GLY THR SER GLY LEU THR ILE CYS GLN LYS ILE ARG ASP LYS HIS THR TYR PRO
CTT CCC GGC ACA AGC GGC CTT ACT ATC TGT CAA AAA ATA AGG GAC AAG CAC ACC TAT CCG

4201

ILE ILE MET LEU THR GLY LYS ASP THR GLU VAL ASP LYS ILE THR GLY LEU THR ILE GLY
ATT ATC ATG CTG ACC GGG AAA GAT ACA GAG GTA GAT AAA ATT ACA GGG TTA ACA ATC GGC

4261

ALA ASP ASP TYR ILE THR LYS PRO PHE ARG PRO LEU GLU LEU ILE ALA ARG VAL LYS ALA
GCG GAT GAT TAT ATA ACG AAG CCC TTT CGC CCA CTG GAG TTA ATT GCT CGG GTA AAG GCC

4321

GLN LEU ARG ARG TYR LYS LYS PHE SER GLY VAL LYS GLU GLN ASN GLU ASN VAL ILE VAL
CAG TTG CGC CGA TAC AAA AAA TTC AGT GGA GTA AAG GAG CAG AAC GAA AAT GTT ATC GTC

62

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4381 HIS SER GLY LEU VAL ILE ASN VAL ASN THR HIS GLU CYS TYR LEU ASN GLU LYS GLN LEU
 CAC TCC GGC CTT GTC ATT AAT GTT AAC ACC CAT GAG TGT TAT CTG AAC GAG AAG CAG TTA
 4441 SER LEU THR PRO THR GLU PHE SER ILE LEU ARG ILE LEU CYS GLU ASN LYS GLY ASN VAL
 TCC CTT ACT CCC ACC GAG TTT TCA ATA CTG CGA ATC CTC TGT GAA AAC AAG GGG AAT GTG
 4501 VAL SER SER GLU LEU LEU PHE HIS GLU ILE TRP GLY ASP GLU TYR PHE SER LYS SER ASN
 GTT AGC TCC GAG CTG CTA TTT CAT GAG ATA TGG GGC GAC GAA TAT TTC AGC AAG AGC AAC
 4561 ASN THR ILE THR VAL HIS ILE ARG HIS LEU ARG GLU LYS MET ASN ASP THR ILE ASP ASN
 AAC ACC ATC ACC GTG CAT ATC CGG CAT TTG CGC GAA AAA ATG AAC GAC ACC ATT GAT AAT
 4621 PRO LYS TYR ILE LYS THR VAL TRP GLY VALGLYTYRLYSILEGLULYS
 CCG AAA TAT ATA AAA ACG GTA TGG GGG GTTGGTTATAAAATTGAAAAAT AAA AAA AAC GAC
 Vans LEUVALILELYSLEULYSASN LYS LYS ASN ASP
 4682 TYR SER LYS LEU GLU ARG LYS LEU TYR MET TYR ILE VAL ALA ILE VAL VAL ALA ILE
 TAT TCC AAA CTA GAA CGA AAA CTT TAC ATG TAT ATC GTT GCA ATT GTT GTG GTA GCA ATT
 4742 VAL PHE VAL LEU TYR ILE ARG SER MET ILE ARG GLY LYS LEU GLY ASP TRP ILE LEU SER
 GTA TTC GTG TTG TAT ATT CGT TCA ATG ATC CGA GGG AAA CTT GGG GAT TGG ATC TTA AGT
 4802 ILE LEU GLU ASN LYS TYR ASP LEU ASN HIS LEU ASP ALA MET LYS LEU TYR GLN TYR SER
 ATT TTG GAA AAC AAA TAT GAC TTA AAT CAC CTG GAC GCG ATG AAA TTA TAT CAA TAT TCC
 4862 ILE ARG ASN ASN ILE ASP ILE PHE ILE TYR VAL ALA ILE VAL ILE SER ILE LEU ILE LEU
 ATA CGG AAC AAT ATA GAT ATC TTT ATT TAT GTG GCG ATT GTC ATT AGT ATT CTT ATT CTA
 4922 CYS ARG VAL MET LEU SER LYS PHE ALA LYS TYR PHE ASP GLU ILE ASN THR GLY ILE ASP
 TGT CGC GTC ATG CTT TCA AAA TTC GCA AAA TAC TTT GAC GAG ATA AAT ACC GGC ATT GAT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4982 VAL LEU ILE GLN ASN GLU ASP LYS GLN ILE GLU LEU SER ALA GLU MET ASP VAL MET GLU
 GTA CTT ATT CAG AAC GAA GAT AAA CAA ATT GAG CTT TCT GCG GAA ATG GAT GTT ATG GAA
 5042
 GLN LYS LEU ASN THR LEU LYS ARG THR LEU GLU LYS ARG GLU GLN ASP ALA LYS LEU ALA
 CAA AAG CTC AAC ACA TTA AAA CGG ACT CTG GAA AAG CGA GAG CAG GAT GCA AAG CTG GCC
 5102
 GLU GLN ARG LYS ASN ASP VAL VAL MET TYR LEU ALA HIS ASP ILE LYS THR PRO LEU THR
 GAA CAA AGA AAA AAT GAC GTT GTT ATG TAC TTG GCG CAC GAT ATT AAA ACG CCC CTT ACA
 5162
 SER ILE ILE GLY TYR LEU SER LEU LEU ASP GLU ALA PRO ASP MET PRO VAL ASP GLN LYS
 TCC ATT ATC GGT TAT TTG AGC CTG CTT GAC GAG GCT CCA GAC ATG CCG GTA GAT CAA AAG
 5222
 ALA LYS TYR VAL HIS ILE THR LEU ASP LYS ALA TYR ARG LEU GLU GLN LEU ILE ASP GLU
 GCA AAG TAT GTG CAT ATC ACG TTG GAC AAA GCG TAT CGA CTC GAA CAG CTA ATC GAC GAG
 5282
 PHE PHE GLU ILE THR ARG TYR ASN LEU GLN THR ILE THR LEU THR LYS THR HIS ILE ASP
 TTT TTT GAG ATT ACA CGG TAT AAC CTA CAA ACG ATA ACG CTA ACA AAA ACG CAC ATA GAC
 5342
 LEU TYR TYR MET LEU VAL GLN MET THR ASP GLU PHE TYR PRO GLN LEU SER ALA HIS GLY
 CTA TAC TAT ATG CTG GTG CAG ATG ACC GAT GAA TTT TAT CCT CAG CTT TCC GCA CAT GGA
 5402
 LYS GLN ALA VAL ILE HIS ALA PRO GLU ASP LEU THR VAL SER GLY ASP PRO ASP LYS LEU
 AAA CAG GCG GTT ATT CAC GCC CCC GAG GAT CTG ACC GTG TCC TCC GGC GAC CCT GAT AAA CTC
 5462
 ALA ARG VAL PHE ASN ASN ILE LEU LYS ASN ALA ALA TYR SER GLU ASP ASN SER ILE
 GCG AGA GTC TTT AAC AAC ATT TTG AAA AAC GCC GCT GCA TAC AGT GAG GAT AAC AGC ATC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

5522 ILE ASP ILE THR ALA GLY LEU SER GLY ASP VAL VAL SER ILE GLU PHE LYS ASN THR GLY
 ILE ASP ILE THR ALA GLY LEU SER GLY ASP VAL VAL SER ILE GLU PHE LYS ASN THR GLY
 ATT GAC ATT ACC GCG GGC CTC TCC GGG GAT GTG GTG TCA ATC GAA TTC AAG AAC ACT GGA
 5582 SER ILE PRO LYS ASP LYS LEU ALA ALA ILE PHE GLU LYS PHE TYR ARG LEU ASP ASN ALA
 SER ILE PRO LYS ASP LYS LEU ALA ALA ILE PHE GLU LYS PHE TYR ARG LEU ASP ASN ALA
 AGC ATC CCA AAA GAT AAG CTA GCT GCC ATA TTT GAA AAG TTC TAT AGG CTG GAC AAT GCT
 5642 ARG SER SER ASP THR GLY GLY GLY ALA GLY LEU GLY LEU ALA ILE ALA LYS GLU ILE ILE VAL
 ARG SER SER ASP THR GLY GLY GLY ALA GLY LEU GLY LEU ALA ILE ALA LYS GLU ILE ILE VAL
 CGT TCT TCC GAT ACG GGT GGC GCG GGA CTT GGA TTG GCG ATT GCA AAA GAA ATT ATT GTT
 5702 GLN HIS GLY GLY GLN ILE TYR ALA GLU SER ASN ASP TYR THR THR PHE ARG VAL GLU
 GLN HIS GLY GLY GLN ILE TYR ALA GLU SER ASN ASP TYR THR THR PHE ARG VAL GLU
 CAG CAT GGA GGG CAG ATT TAC GCG GAA AGC AAT GAT AAC TAT ACG ACG TTT AGG GTA GAG
 5762 LEU PRO ALA MET PRO ASP LEU VAL ASP LYS ARG ARG SER
 LEU PRO ALA MET PRO ASP LEU VAL ASP LYS ARG ARG SER
 CTT CCA GCG ATG CCA GAC TTG GTT GAT AAA AGG AGG TCC TAA GA GAT GTA TAT AAT TTT
 5821 TTA GGA AAA TCT CAA GGT TAT CTT TAC TTT TTC TTA GGA AAT TAA CAA TTT AAT ATT AAG
 TTA GGA AAA TCT CAA GGT TAT CTT TAC TTT TTC TTA GGA AAT TAA CAA TTT AAT ATT AAG
 5881 AAA CGG CTC GTT CTT ACA CGG TAG ACT TAA TAC CGT AAG AAC GAG CCG TTT TCG TTC TTC
 AAA CGG CTC GTT CTT ACA CGG TAG ACT TAA TAC CGT AAG AAC GAG CCG TTT TCG TTC TTC
 5941 AGA GAA AGA TTT GAC AAG ATT ACC ATT GGC ATC CCC GTT TTA TTT GGT GCC TTT CAC AGA
 AGA GAA AGA TTT GAC AAG ATT ACC ATT GGC ATC CCC GTT TTA TTT GGT GCC TTT CAC AGA
 6001
 VanH MET ASN ASN ILE GLY ILE THR VAL TYR GLY CYS GLU GLN ASP GLU
 AAGGGTTGG TCT TAA TT ATG AAT AAC ATC GGC ATT ACT GTT TAT GGA TGT GAG CAG GAT GAG
 6063 ALA ASP ALA PHE HIS ALA LEU SER PRO ARG PHE GLY VAL MET ALA THR ILE ILE ASN ALA
 ALA ASP ALA PHE HIS ALA LEU SER PRO ARG PHE GLY VAL MET ALA THR ILE ILE ASN ALA
 GCA GAT GCA TTC CAT GCT CTT TCG CCT CGC TTT GGC GTT ATG GCA ACG ATA ATT AAC GCC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

6123 ASN VAL SER GLU SER ASN ALA LYS SER ALA PRO PHE ASN GLN CYS ILE SER VAL GLY HIS
 AAC GTG TCG GAA TCC AAC GCC AAA TCC GCG CCT TTC AAT CAA TGT ATC AGT GTG GGA CAT
 6183
 LYS SER GLU ILE SER ALA SER ILE LEU LEU ALA LEU LYS ARG ALA GLY VAL LYS TYR ILE
 AAA TCA GAG ATT TCC GCC TCT ATT CTT CCG CTG AAG AGA GCC GGT GTG AAA TAT ATT
 6243
 SER THR ARG SER ILE GLY CYS ASN HIS ILE ASP THR THR ALA ALA LYS ARG MET GLY ILE
 TCT ACC CGA AGC ATC GGC TGC AAT CAT ATA GAT ACA ACT GCT GCT AAG AGA ATG GGC ATC
 6303
 THR VAL ASP ASN VAL ALA TYR SER PRO ASP SER VAL ALA ASP TYR THR MET MET LEU ILE
 ACT GTC GAC AAT GTG GCG TAC TCG CCG GAT AGC GTT GCC GAT TAT ACT ATG ATG CTA ATT
 6363
 LEU MET ALA VAL ARG ASN VAL LYS SER ILE VAL ARG SER VAL GLU LYS HIS ASP PHE ARG
 CTT ATG GCA GTA CGC AAC GTA AAA TCG ATT GTG CGC TCT GTG GAA AAA CAT GAT TTC AGG
 6423
 LEU ASP SER ASP ARG GLY LYS VAL LEU SER ASP MET THR VAL GLY VAL GLY THR GLY
 TTG GAC AGC GAC CGT GGC AAG GTA CTC AGC GAC ATG ACA GTT GGT GTG GTG GGA ACG GGC
 6483
 GLN ILE GLY LYS ALA VAL ILE GLU ARG LEU ARG GLY PHE GLY CYS LYS VAL LEU ALA TYR
 CAG ATA GGC AAA GCG GTT ATT GAG CGG CTG CGA GGA TTT GGA TGT AAA GTG TTG GCT TAT
 6543
 SER ARG SER ARG SER ILE GLU VAL ASN TYR VAL PRO PHE ASP GLU LEU LEU GLN ASN SER
 AGT CGC AGC CGA AGT ATA GAG GTA AAC TAT GTA CCG TTT GAT GAG TTG CTG CAA AAT AGC
 6603
 ASP ILE VAL THR LEU HIS VAL PRO LEU ASN THR ASP THR HIS TYR ILE ILE SER HIS GLU
 GAT ATC GTT ACG CTT CAT GTG CCG CTC AAT ACG GAT ACG CAC TAT ATT ATC AGC CAC GAA
 6663
 GLN ILE GLN ARG MET LYS GLN GLY ALA PHE LEU ILE ASN THR GLY ARG GLY PRO LEU VAL
 CAA ATA CAG AGA ATG AAG CAA GGA GCA TTT CTT ATC AAT ACT GGG CGC GGT CCA CTT GTA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

6723 ASP THR TYR GLU LEU VAL LYS ALA LEU GLY ASN GLY LYS LEU GLY GLY ALA ALA LEU ASP
 GAT ACC TAT GAG TTG GTT AAA GCA TTA GAA AAC GGG AAA CTG GGC GGT GCC GCA TTG GAT
 6783 VAL LEU GLU GLY GLU GLU PHE PHE TYR SER ASP CYS THR GLN LYS PRO ILE ASP ASN
 GTA TTG GAA GGA GAG GAG GAA GAG TTT TTC TAC TCT GAT TGC ACC CAA AAA CCA ATT GAT AAT
 6843 GLN PHE LEU LEU LYS LEU GLN ARG MET PRO ASN VAL ILE ILE THR PRO HIS THR ALA TYR
 CAA TTT TTA CTT AAA CTT CAA AGA ATG CCT AAC GTG ATA ATC ACA CCG CAT ACG GCC TAT
 6903 TYR THR GLU GLN ALA LEU ARG ASP THR VAL GLU LYS THR ILE LYS ASN CYS LEU ASP PHE
 TAT ACC GAG CAA GCG TTG CGT GAT ACC GTT GAA AAA ACC ATT AAA AAC TGT TTG GAT TTT
 6963 VADA METASN ARG ILE LYS VAL ALA ILE LEU PHE GLY GLY CYS SER
 GAA AGG AGA CAG GAG CATGAAT AGA ATA AAA GTT GCA ATA CTG TTT GGG GGT TGC TCA
 GLU ARG ARG GLN GLU HISGLU
 7021 GLU GLU HIS ASP VAL SER VAL LYS SER ALA ILE GLU ILE ALA ALA ASN ILE ASN LYS GLU
 GAG GAG CAT GAC GTA TCG GTA AAA TCT GCA ATA GAG ATA GCC GCT AAC ATT AAT AAA GAA
 7081 LYS TYR GLU PRO LEU TYR ILE GLY ILE THR LYS SER GLY VAL TRP LYS MET CYS GLU LYS
 AAA TAC GAG CCG TTA TAC ATT GGA ATT ACG AAA TCT GGT GTA TGG AAA ATG TGC GAA AAA
 7141 PRO CYS ALA GLU TRP GLU ASN ASP ASN CYS TYR SER ALA VAL LEU SER PRO ASP LYS LYS
 CCT TGC GCG GAA TGG GAA AAC GAC AAT TGC TAT TCA GCT GTA CTC TCG CCG GAT AAA AAA
 7201 MET HIS GLY LEU LEU VAL LYS LYS ASN HIS GLU TYR GLU ILE ASN HIS VAL ASP VAL ALA
 ATG CAC GGA TTA CTT GTT AAA AAG AAC CAT GAA TAT GAA ATC AAC CAT GTT GAT GTA GCA

FEUILLE DE DEPLACEMENT

7261 PHE SER ALA LEU HIS GLY LYS SER GLY GLU ASP GLY SER ILE GLN GLY LEU PHE GLU LEU
 TTT TCA GCT TTG CAT GGC AAG TCA GGT GAA GAT GGA TCC ATA CAA GGT CTG TTT GAA TTG
 7321
 SER GLY ILE PRO PHE VAL GLY CYS ASP ILE GLN SER SER ALA ILE CYS MET ASP LYS SER
 TCC GGT ATC CCT TTT GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC TCA GCA ATT TGT ATG GAC AAA TCG
 7381
 LEU THR TYR ILE VAL ALA LYS ASN ALA GLY ILE ALA THR PRO ALA PHE TRP VAL ILE ASN
 TTG ACA TAC ATC GTT GCG AAA AAT GCT GGT ATA GCT ACT CCC GCC TTT TGG GTT ATT AAT
 7441
 LYS ASP ASP ARG PRO VAL ALA ALA THR PHE THR TYR PRO VAL PHE VAL LYS PRO ALA ARG
 AAA GAT GAT AGG CCG GTG GCA GCT ACG TTT ACC TAT CCT GTT TTT GTT AAG CCG GCG CGT
 7501
 SER GLY SER SER PHE GLY VAL LYS LYS VAL ASN SER ALA ASP GLU LEU ASP TYR ALA ILE
 TCA GGC TCA TCC TTC GGT GTG AAA AAA GTC AAT AGC GCG GAC GAA TTG GAC TAC GCA ATT
 7561
 GLU SER ALA ARG GLN TYR ASP SER LYS ILE LEU ILE GLU GLN ALA VAL SER GLY CYS GLU
 GAA TCG GCA AGA CAA TAT GAC AGC AAA ATC TTA ATT GAG CAG GCT GTT TCG GGC TGT GAG
 7621
 VAL GLY CYS ALA VAL LEU GLY ASN SER ALA ALA LEU VAL VAL GLY GLU VAL ASP GLN ILE
 GTC GGT TGT GCG GTA TTG GGA AAC AGT GCC GCG TTA GTT GTT GGC GAG GTG GAC CAA ATC
 7681
 ARG LEU GLN TYR GLY ILE PHE ARG ILE HIS GLN GLU VAL GLU PRO GLU LYS GLY SER GLU
 AGG CTG CAG TAC GGA ATC TTT CGT ATT CAT CAG GAA GTC GAG CCG GAA AAA GGC TCT GAA
 7741
 ASN ALA VAL ILE THR VAL PRO ALA ASP LEU SER ALA GLU GLU ARG GLY ARG ILE GLN GLU
 AAC GCA GTT ATA ACC GTT CCC GCA GAC CTT TCA GCA GAG GAG CGA GGA CGG ATA CAG GAA
 7801
 THR ALA LYS LYS ILE TYR LYS ALA LEU GLY CYS ARG GLY LEU ALA ARG VAL ASP MET PHE
 ACG GCA AAA AAA ATA TAT AAA GCG CTC GGC TGT AGA GGT CTA GCC CGT GTG GAT ATG TTT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

7861 LEU GLN ASP ASN GLY ARG ILE VAL LEU ASN GLU VAL ASN THR LEU PRO GLY PHE THR SER
 TTA CAA GAT AAC GGC CGC ATT GTA CTG AAC GAA GTC AAT ACT CTG CCC GGT TTC ACG TCA
 7921 TYR SER ARG TYR PRO ARG MET MET ALA ALA GLY ILE ALA LEU PRO GLU LEU ILE ASP
 TAC AGT CGT TAT CCC CGT ATG ATG GCC GCT GCA GGT ATT GCA CTT CCC GAA CTG ATT GAC
 7981 ARG LEU ILE VAL LEU ALA LEU LYS GLY
 CGC TTG ATC GTA TTA GCG TTA AAG GGG TGATAAGC ATG GAA ATA GGA TTT ACT TTT TTA GAT
 VanX MET GLU ILE GLY PHE THR PHE LEU ASP
 8043 GLU ILE VAL HIS GLY VAL ARG TRP ASP ALA LYS TYR ALA THR TRP ASP ASN PHE THR GLY
 GAA ATA GTA CAC GGT GTT CGT TGG GAC GCT AAA TAT GCC ACT TGG GAT AAT TTC ACC GGA
 8103 LYS PRO VAL ASP GLY TYR GLU VAL ASN ARG ILE VAL GLY THR TYR GLU LEU ALA GLU SER
 AAA CCG GTT GAC GGT TAT GAA GTA AAT CGC ATT GTA GGG ACA TAC GAG TTG GCT GAA TCG
 8163 LEU LEU LYS ALA LYS GLU LEU ALA ALA THR GLN GLY TYR GLY LEU LEU TRP ASP GLY
 CTT TTG AAG GCA AAA GAA GAA CTG GCT GCT ACC CAA GGG TAC GGA TTG CTT CTA TGG GAC GGT
 8223 TYR ARG PRO LYS ARG ALA VAL ASN CYS PHE MET GLN TRP ALA ALA GLN PRO GLU ASN ASN
 TAC CGT CCT AAG CGT GCT GTA AAC TGT TTT ATG CAA TGG GCT GCA CAG CCG GAA AAT AAC
 8283 LEU THR LYS GLU SER TYR TYR PRO ASN ILE ASP ARG THR GLU MET ILE SER LYS GLY TYR
 CTG ACA AAG GAA AGT TAT TAT CCC AAT ATT GAC CGA ACT GAG ATG ATT TCA AAA GGA TAC
 8343 VAL ALA SER LYS SER SER HIS SER ARG GLY SER ALA ILE ASP LEU THR LEU TYR ARG LEU
 GTG GCT TCA AAA TCA AGC CAT AGC CGC GGC AGT GCC ATT GAT CTT ACG CTT TAT CGA TTA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

8403 ASP THR GLY GLU LEU VAL PRO MET GLY SER ARG PHE ASP PHE MET ASP GLU ARG SER HIS
 GAC ACG GGT GAG CTT GTA CCA ATG GGG AGC CGA TTT GAT TTT ATG GAT GAA CGC TCT CAT
 8463
 HIS ALA ALA ASN GLY ILE SER CYS ASN GLU ALA GLN ASN ARG ARG LEU ARG SER ILE
 CAT GCG GCA AAT GGA ATA TCA TGC AAT GAA GCG CAA AAT CGC AGA CGT TTG CGC TCC ATC
 8523
 MET GLU ASN SER GLY PHE GLU ALA TYR SER LEU GLU TRP TRP HIS TYR VAL LEU ARG ASP
 ATG GAA AAC AGT GGG TTT GAA GCA TAT AGC CTC GAA TGG TGG CAC TAT GTA TTA AGA GAC
 8583
 GLU PRO TYR PRO ASN SER TYR PHE ASP PHE PRO VAL LYS
 GAA CCA TAC CCC AAT AGC TAT TTT GAT TTC CCC GTT AAA TAAA CTT TTA ACC GTT GCA
 8641
 CGG ACA AAC TAT ATA AGC TAA CTC TTT CGG CAG GAA ACC CGA CGT ATG TAA CTG GTT CTT
 8701
 AGG GAA TTT ATA TAT AGT AGA TAG TAT TGA AGA TGT AAG GCA GAG CGA TAT TGC GGT CAT
 8761
 TAT CTG CGT GCG CTG CCG CAA GAT AGC CTG ATA ATA AGA CTG ATC GCA TAG AGG GGT GGT
 8821
 ATT TCA CAC CGC CCA TTG TCA ACA GGC AGT TCA GCC TCG TTA AAT TCA GCA TGG GTA TCA
 8881
 CTT ATG AAA ATT CAT CTA CAT TGG TGA TAA TAG TAA ATC CAG TAG GGC GAA ATA ATT GAC
 8941
 TGT AAT TTA CCG GGC AAA ACG GCA CAA TCT CAA ACG AGA TTG TGC CGT TTA AGG GGA AGA
 9001
 TTC TAG AAA TAT TTC ATA CTT CCA ACT ATA TAG TTA AGG AGG AGA CTG AAA ATG AAG AAG
 9061
 LEU PHE PHE LEU LEU LEU LEU PHE LEU ILE TYR LEU GLY TYR ASP TYR VAL ASN GLU
 TTG TTT TTT TTA TTG TTA TTG TTA TTC TTA ATA TAC TTA GGT TAT GAC TAC GTT AAT GAA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

9121 ALA LEU PHE SER GLN GLU LYS VAL GLU PHE GLN ASN TYR ASP GLN ASN PRO LYS GLU HIS
 GCA CTG TTT TCT CAG GAA AAA GTC GAA TTT CAA AAT TAT GAT CAA AAT CCC AAA GAA CAT
 9181 LEU GLU ASN SER GLY THR SER GLU ASN THR GLN GLU LYS THR ILE THR GLU GLU GLN VAL
 TTA GAA AAT AGT GGG ACT TCT GAA AAT ACC CAA GAG AAA ACA ATT ACA GAA GAA CAG GTT
 9241 TYR GLN GLY ASN LEU LEU LEU ILE ASN SER LYS TYR PRO VAL ARG GLN GLU SER VAL LYS
 TAT CAA GGA AAT CTG CTA TTA ATC AAT AGT AAA TAT CCT GTT CGC CAA GAA AGT GTG AAG
 9301 SER ASP ILE VAL ASN LEU SER LYS HIS ASP GLU LEU ILE ASN GLY TYR GLY LEU LEU ASP
 TCA GAT ATC GTG AAT TTA TCT AAA CAT GAC GAA TTA ATA AAT GGA TAC GGG TTG CTT GAT
 9361 SER ASN ILE TYR MET SER LYS GLU ILE ALA GLN LYS PHE SER GLU MET VAL ASN ASP ALA
 AGT AAT ATT TAT ATG TCA AAA GAA ATA GCA CAA AAA TTT TCA GAG ATG GTC AAT GAT GCT
 9421 VAL LYS GLY GLY VAL SER HIS PHE ILE ILE ASN SER GLY TYR ARG ASP PHE ASP GLU GLN
 GTA AAG GGT GGC GTT AGT CAT TTT ATT ATT AAT AGT GGC TAT CGA GAC TTT GAT GAG CAA
 9481 SER VAL LEU TYR GLN GLU MET GLY ALA GLU TYR ALA LEU PRO ALA GLY TYR SER GLU HIS
 AGT GTG CTT TAC CAA GAA ATG GGG GCT GAG TAT GCC TTA CCA GCA GGT TAT AGT GAG CAT
 9541 ASN SER GLY LEU SER LEU ASP VAL GLY SER SER LEU THR LYS MET GLU ARG ALA PRO GLU
 AAT TCA GGT TTA TCA CTA GAT GTA GGA TCA AGC TTG ACG AAA ATG GAA CGA GCC CCT GAA
 9601 GLY LYS TRP ILE GLU GLU ASN ALA TRP LYS TYR GLY PHE ILE LEU ARG TYR PRO GLU ASP
 GGA AAG TGG ATA GAA GAA AAT GCT TGG AAA TAC GGG TTC ATT TTA CGT TAT CCA GAG GAC
 9661 LYS THR GLU LEU THR GLY ILE GLN TYR GLU PRO TRP HIS ILE ARG TYR VAL GLY LEU PRO
 AAA ACA GAG TTA ACA GGA ATT CAA TAT GAA CCA TGG CAT ATT CGC TAT GTT GGT TTA CCA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

9721 HIS SER ALA ILE MET LYS GLU LYS ASN PHE VAL LEU GLU GLU TYR MET ASP TYR LEU LYS
 CAT AGT GCG ATT ATG AAA GAA AAG AAT TTC GTT CTC GAG GAA TAT ATG GAT TAC CTA AAA
 9781
 GLU GLU LYS THR ILE SER VAL SER VAL ASN GLY GLU LYS TYR GLU ILE PHE TYR TYR PRO
 GAA GAA AAA ACC ATT TCT GTT AGT GTA AAT GGG GAA AAA TAT GAG ATC TTT TAT TAT CCT
 9841
 VAL THR LYS ASN THR THR ILE HIS VAL PRO THR ASN LEU ARG TYR GLU ILE SER GLY ASN
 GTT ACT AAA AAT ACC ACC ATT CAT GTG CCG ACT AAT CTT CGT TAT GAG ATA TCA GGA AAC
 9901
 ASN ILE ASP GLY VAL ILE VAL THR VAL PHE PRO GLY SER THR HIS THR ASN SER ARG ARG
 AAT ATA GAC GGT GTA ATT GTG ACA GTG TTT CCC GGA TCA ACA CAT ACT AAT TCA AGG AGG
 9961
 TAA GGA TGG CGG AAT GAA ACC AAC GAA ATT AAT GAA CAG CAT TAT TGT ACT AGC ACT TTT
 10021
 GGG GTA ACG TTA GCT TTT TAA TTT AAA ACC CAC GTT AAC TAG GAC ATT GCT ATA CTA ATG
 10081
 ATA CAA CTT AAA CAA AAG AATTAGAGG AAA TTA TA TTG GGA AAA ATA TTA TCT AGA GGA TTG
 10143
 LEU ALA LEU TYR LEU VAL THR LEU ILE TRP LEU VAL LEU PHE LYS LEU GLN TYR ASN ILE
 CTA GCT TTA TAT TTA GTG ACA CTA ATC TGG TTA GTG TTA TTC AAA TTA CAA TAC AAT ATT
 10203
 LEU SER VAL PHE ASN TYR HIS GLN ARG SER LEU ASN LEU THR PRO PHE THR ALA THR GLY
 TTA TCA GTA TTT AAT TAT CAT CAA AGA AGT CTT AAC TTG ACT CCA TTT ACT GCT ACT GGG
 10263
 ASN PHE ARG GLU MET ILE ASP ASN VAL ILE ILE PHE ILE PRO PHE GLY LEU LEU ASN
 AAT TTC AGA GAG ATG ATA GAT AAT GTT ATA ATC TTT ATT CCA TTT GGC TTG CTT TTG AAT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10323 VAL ASN PHE LYS GLU ILE GLY PHE LEU PRO LYS PHE ALA PHE VAL LEU VAL LEU SER LEU
 GTC AAT TTT AAA GAA ATC GGA TTT TTA CCT AAG TTT GCT TTT GTA CTG GTT TTA AGT CTT
 10383 THR PHE GLU ILE ILE GLN PHE ILE PHE ALA ILE GLY ALA THR ASP ILE THR ASP VAL ILE
 ACT TTT GAA ATA ATT CAA TTT ATC TTC GCT ATT GGA GCG ACA GAC ATA ACA GAT GTA ATT
 10443 THR ASN THR VAL GLY GLY PHE LEU GLY LEU LYS LEU TYR GLY LEU SER ASN LYS HIS MET
 ACA AAT ACT GTT GGA GGC TTT CTT GGA CTG AAA TTA TAT GGT TTA AGC AAT AAG CAT ATG
 10503 ASN GLN LYS LYS LEU ASP ARG VAL ILE ILE PHE VAL GLY ILE LEU LEU VAL LEU LEU
 AAT CAA AAA AAA TTA GAC AGA GTT ATT ATT TTT GTA GGT ATA CTT TTG CTC GTA TTA TTG
 10563 LEU VAL TYR ARG THR HIS LEU ARG ILE ASN TYR VAL
 CTC GTT TAC CGT ACC CAT TTA AGA ATA AAT TAC GTG TAAG ATG TCT AAA TCA AGC AAT
 10621 CTG ATC TTT CAT ACA CAT AAA GAT ATT GAA TGA ATT GGA TTA GAT GGA AAA CGG GAT GTG
 10681 GGG AAA CTC GCC CGT AGG TGT GAA GTG AGG GGA AAA CCG GTG ATA AAG TAA AAA GCT TAC
 10741 CTA ACA CTA TAG TAA CAA AGA AAG CCC AAT TAT CAA TTT TAG TGC TGA GGA ATT GGT CTC
 10801 TTT AAT AAA TTT CCT TAA CGT TGT AAA TCC GCA TTT TCC TGA CGG TAC CCC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Ib brin(-)

(correspond à la séquence du brin complémentaire du brin (+) de la position 1 à 3189

1 CAA AAT ATC ACC TCA TTT TTG AGA CAA GTC TTA TGA GAC GCT CTT AAC TAT GAT TTT ATC
61 AGT CTA CTA CAT TTG TAT CAA TAG AGT ACA CTC TAT TGA TAT ATA ATT GAA CTA ATA AAT

121 **Transposase** MET LYS ILE ALA ARG GLY ARG GLU LEU LEU THR
TGA AAA TAC AGA AAT GGA ATGATACTG AA ATG AAA ATT GCG AGA GGT AGA GAA TTG CTT ACA
182 PRO GLU GLN ARG GLN ALA PHE MET GLN ILE PRO GLU ASP GLU TRP ILE LEU GLY THR TYR
CCG GAA CAG AGA CAG GCT TTT ATG CAA ATC CCT GAA GAT GAA TGG ATA CTG GGG ACC TAC
242 PHE THR PHE SER LYS ARG ASP LEU GLU ILE VAL ASN LYS ARG ARG GLU GLU ASN ARG
TTC ACT TTT TCC AAA CCG GAT TTA GAA ATA GTT AAT AAG CGA AGG AGG GAA GAA AAC CGT
302 LEU GLY PHE ALA VAL GLN LEU ALA VAL LEU ARG TYR PRO GLY TRP PRO TYR THR HIS ILE
TTA GGA TTT GCT GTT CAA TTA GCT GTT CTT CGG TAT CCC GGT TGG CCA TAC ACT CAT ATC
362 LYS SER ILE PRO ASP SER VAL ILE GLN TYR ILE SER LYS GLN ILE GLY VAL SER PRO SER
AAA AGC ATC CCA GAT TCG GTC ATA CAA TAT ATA TCG AAA CAG ATT GGT GTT AGT CCA TCC
422 SER LEU ASP HIS TYR PRO GLN ARG GLU ASN THR LEU TRP ASP HIS LEU LYS GLU ILE ARG
TCG CTT GAT CAT TAT CCT CAA AGG GAA AAT ACA CTT TGG GAT CAT TTG AAA GAA ATT CGA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

482 SER GLU TYR ASP PHE VAL THR PHE THR LEU SER GLU TYR ARG MET THR PHE LYS TYR LEU
 AGT GAA TAC GAC TTT GTA ACT TTT ACC CTG AGT GAA TAT CGA ATG ACA TTT AAG TAC CTT
 542 HIS GLN LEU ALA LEU GLU ASN GLY ASP ALA ILE HIS LEU LEU HIS GLU CYS ILE ASP PHE
 CAT CAA TTA GCT TTG GAA AAT GGT GAT GCC ATT CAT CTA CTG CAT GAA TGC ATA GAT TTT
 602 LEU ARG LYS ASN LYS ILE ILE LEU PRO ALA ILE THR THR LEU GLU ARG MET VAL TRP GLU
 CTA AGA AAA AAC AAA ATT ATA CTG CCT GCT ATC ACT ACA CTT GAA AGA ATG GTG TGG GAA
 662 ALA ARG ALA MET ALA GLU LYS LYS LEU PHE ASN THR VAL SER LYS SER LEU THR ASN GLU
 GCA AGG GCA ATG GCT GAA AAG AAG CTA TTT AAT ACG GTT AGT AAA TCT CTA ACA AAT GAG
 722 GLN LYS GLU LYS LEU GLU GLY ILE ILE THR SER GLN HIS PRO SER GLU SER ASN LYS THR
 CAA AAA GAA AAG CTT GAA GGG ATT ATT ACC TCG CAG CAT CCA TCC GAA TCC AAT AAA ACG
 782 ILE LEU GLY TRP LEU LYS GLU PRO PRO GLY HIS PRO SER PRO GLU THR PHE LEU LYS ILE
 ATA TTG GGT TGG TTA AAA GAG CCA CCG GGT CAT CCT TCA CCC GAA ACT TTT CTA AAA ATA
 842 ILE GLU ARG LEU GLU TYR ILE ARG GLY MET ASP LEU GLU THR VAL GLN ILE SER HIS LEU
 ATA GAA CGA CTC GAA TAC ATA CGA GGA ATG GAT TTA GAA ACA GTG CAA ATT AGT CAT TTG
 902 HIS ARG ASN ARG LEU LEU GLN LEU SER ARG LEU GLY SER ARG TYR GLU PRO TYR ALA PHE
 CAC CGT AAC CGC CTG TTG CAG CTG TCT CGC TTA GGC TCA AGA TAC GAG CCG TAT GCA TTC
 962 ARG ASP PHE GLN GLU ASN LYS ARG TYR SER ILE LEU THR ILE TYR LEU LEU GLN LEU THR
 CGT GAC TTT CAA GAA AAT AAA CGT TAT TCG ATA TTA ACC ATC TAT TTA TTA CAA CTT ACT

FEUILLE DE DEPLACEMENT

1022 GLN GLU LEU THR ASP LYS ALA PHE GLU ILE HIS ASP ARG GLN ILE LEU SER LEU LEU SER
 CAG GAG CTA ACG GAT AAA GCG TTT GAA ATT CAT GAT AGG CAA ATA CTT AGT TTT TTA TCA
 1082
 LYS GLY ARG LYS ALA GLN GLU ILE GLN LYS GLN ASN GLY LYS LYS LEU ASN GLU LYS
 AAA GGT CGT AAG GCT CAA GAG GAA ATC CAG AAA CAA AAC GGT AAA AAG CTA AAT GAG AAA
 1142
 VAL ILE HIS PHE THR ASN ILE GLY GLN ALA LEU ILE LYS ALA ARG GLU LYS LEU ASP
 GTT ATA CAC TTT ACG AAC ATC GGA CAA GCA TTA ATT AAA GCA AGA GAG GAA AAA TTA GAC
 1202
 VAL PHE LYS VAL LEU GLU SER VAL ILE GLU TRP ASN THR PHE VAL SER SER VAL GLU GLU
 GTT TTT AAG GTT TTA GAA TCG GTT ATT GAA TGG AAT ACC TTT GTC TCT TCA GTA GAA GAG
 1262
 ALA GLN GLU LEU ALA ARG PRO ALA ASP TYR ASP TYR LEU ASP LEU LEU GLN LYS ARG PHE
 GCT CAG GAA CTT GCA CGT CCT GCC GAC TAT GAT TAT TTA GAC TTA CTG CAA AAA CGG TTT
 1322
 TYR SER LEU ARG LYS TYR THR PRO THR LEU LEU ARG VAL LEU GLU PHE HIS SER THR LYS
 TAT TCA CTA AGA AAA TAT ACG CCA ACG CTA TTA AGA GTA TTG GAA TTT CAT TCT ACA AAG
 1382
 ALA ASN GLU PRO LEU LEU GLN ALA VAL GLU ILE ILE ARG GLY MET ASN GLU SER GLY LYS
 GCA AAT GAG CCA CTT TTA CAA GCT GTT GAG ATT ATC CGA GGA ATG AAC GAA TCT GGA AAG
 1442
 ARG LYS VAL PRO ASP ASP SER PRO VAL ASP PHE ILE SER LYS ARG TRP LYS ARG HIS LEU
 CGA AAA GTG CCT GAT GAT GAC TCA CCT GTG GAT TTT ATT TCA AAA CGA TGG AAA AGA CAT TTA
 1502
 TYR GLU ASP ASP GLY THR THR ILE ASN ARG HIS TYR TYR GLU MET ALA VAL LEU THR GLU
 TAC GAG GAT GAT GGT ACA ACA ATT AAT CGT CAT TAC TAT GAA ATG GCT GTT TTA ACA GAA
 1562
 LEU ARG GLU HIS VAL ARG ALA GLY ASP VAL SER ILE VAL GLY SER ARG GLN TYR ARG ASP
 CTT CGG GAG CAT GTT CGG GCA GGA GAT GTT TCC ATT GTT GGC AGC AGA CAA TAT AGG GAT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

1622 PHE GLU GLU TYR LEU PHE SER GLU ASP THR TRP ASN GLN SER LYS GLY ASN THR ARG LEU
 TTT GAG GAA TAT TTG TTT TCG GAA GAT ACA TCG AAT CAA TCG AAG GGG AAT ACG AGA TTA
 1682 SER VAL SER LEU SER PHE GLU ASP TYR ILE THR GLU ARG THR SER SER PHE ASN GLU ARG
 TCA GTT AGT TTA TCA TTC GAA GAT TAT ATA ACG GAG AGA ACC AGC AGC TTT AAT GAA AGG
 1742 LEU LYS TRP LEU ALA ALA ASN SER ASN LYS LEU ASP GLY VAL SER LEU GLU LYS GLY LYS
 TTA AAG TGG TTA GCT GCC AAT TCC AAT AAG TTA GAT GGG GTT TCT CTT GAA AAA GGA AAG
 1802 LEU SER LEU ALA ARG LEU GLU LYS ASP VAL PRO GLU GLU ALA LYS LYS PHE SER ALA SER
 CTA TCA CTT GCA CGC TTA GAA AAA GAT GTT CCA GAA GAA GCA AAA AAA TTT AGT GCA AGC
 1862 LEU TYR GLN MET LEU PRO ARG ILE LYS LEU THR ASP LEU LEU MET ASP VAL ALA HIS ILE
 CTT TAT CAG ATG CTA CCA AGA ATA AAA TTA ACT GAT TTA CTC ATG GAT GTG GCC CAT ATA
 1922 THR GLY PHE HIS GLU GLN PHE THR HIS ALA SER ASN ASN ARG LYS PRO ASP LYS GLU GLU
 ACA GGA TTT CAT GAG CAA TTC ACT CAT GCT TCC AAT AAT CGA AAA CCA GAT AAG GAA GAA
 1982 THR ILE ILE ILE MET ALA ALA LEU LEU GLY MET GLY MET ASN ILE GLY LEU SER LYS MET
 ACA ATC ATT ATC ATG GCT GCC CTT TTA GGA ATG GGA ATG AAT ATT GGC TTG AGC AAG ATG
 2042 ALA GLU ALA THR PRO GLY LEU THR TYR LYS GLN LEU ALA ASN VAL SER GLN TRP ARG MET
 GCC GAA GAA ACC ACA CCC GGA CTT ACA TAT AAG CAA CTA GCC AAT GTA TCT CAA TGG CGC ATG
 2102 TYR GLU ASP ALA MET ASN LYS ALA GLN ALA ILE LEU VAL ASN PHE HIS HIS LYS LEU GLN
 TAT GAA GAT GCC ATG AAT AAA GCC CAA GCC ATA TTA GTA AAC TTT CAT CAT AAA TTA CAA
 2162 LEU PRO PHE TYR TRP GLY ASP GLY THR THR SER SER ASP GLY MET ARG MET GLN LEU
 TTG CCT TTC TAT TGG GGC GAC GGT ACA ACA TCT TCG TCA GAT GGT ATG AGA ATG CAG CTA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

2222 GLY VAL SER SER LEU HIS ALA ASP ALA ASN PRO HIS TYR GLY THR GLY LYS GLY ALA THR
 GGT GTT TCA TCA CTA CAT GCA GAT GCA AAT CCA CAT TAT GGA ACT GGA AAA GGA GCC ACC
 2282 ILE TYR ARG PHE THR SER ASP GLN PHE SER SER TYR TYR THR LYS ILE ILE HIS THR ASN
 ATC TAC CGA TTT ACA AGT GAT CAA TTC TCT TCT TAC ACA AAG ATT ATT CAT ACT AAT
 2342 SER ARG ASP ALA ILE HIS VAL LEU ASP GLY LEU LEU HIS HIS GLU THR ASP LEU ASN ILE
 TCA AGA GAT GCG ATT CAT GTT TTG GAT GGT TTG TTA CAT CAT GAG ACG GAT CTA AAC ATA
 2402 GLU GLU HIS TYR THR ASP THR ALA GLY TYR THR ASP GLN ILE PHE GLY LEU THR HIS LEU
 GAG GAA CAT TAT ACA GAC ACT GCC GGT TAC ACT GAC CAA ATA TTC GGA CTG ACT CAT TTA
 2462 LEU GLY PHE LYS PHE ALA PRO ARG ILE ARG ASP LEU SER ASP SER LYS LEU PHE THR ILE
 TTA GGA TTT AAA TTT GCC CCA AGA ATA AGG GAT TTA TCG GAC TCA AAA TTA TTT ACG ATA
 2522 ASP LYS ALA SER GLU TYR PRO LYS LEU GLU ALA ILE LEU ARG GLY GLN ILE ASN THR LYS
 GAT AAA GCA AGT GAG TAT CCA AAA CTA GAA GCC ATT TTA CGT GGA CAA ATA AAT ACA AAG
 2582 VAL ILE LYS GLU ASN TYR GLU ASP VAL LEU ARG LEU ALA HIS SER ILE ARG GLU GLY THR
 GTC ATT AAA GAA AAT TAT GAG GAT GTT TTG CGA TTA GCT CAT TCT ATA AGG GAG GGA ACA
 2642 AGT TTC AGC ATC CCT TAT TAT GGG GAA GCT AGG TTC CTA TTC AAG ACA AAA CAG CTT AGC
 VAL SER ALA SER LEU ILE MET GLY LYS LEU GLY SER TYR SER ARG GLN ASN SER LEU ALA
 GTT TCA GCA TCC CTT ATT ATG GGG AAG CTA GGT TCC TAT TCA AGA CAA AAC AGC TTA GCT
 2702 THR ALA LEU ARG GLU MET GLY ARG ILE GLU LYS THR ILE PHE ILE LEU ASN TYR ILE SER
 ACA GCC TTA CGT GAG ATG GGC CGA ATA GAA AAA ACG ATC TTT ATT TTG AAT TAT ATA TCG

FEUILLE DE REMPLACEMENT

2762 ASP GLU SER LEU ARG ARG LYS ILE GLN ARG GLY LEU ASN LYS GLY GLU ALA MET ASN GLY
 GAT GAA TCA TTA AGA AGA AAA ATA CAA AGA GGA TTG AAT AAA GGA GAA GCC ATG AAT GGA
 2822 LEU ALA ARG ALA ILE PHE PHE GLY LYS GLN GLY LEU ARG GLU ARG THR ILE GLN HIS
 TTG GCA AGA GCT ATT TTC TTC GGA AAA CAA GGT GAG CTT AGA GAA CGC ACC ATA CAG CAT
 2882 GLN LEU GLN ARG ALA SER ALA LEU ASN ILE ILE ILE ASN ALA ILE SER ILE TRP ASN THR
 CAA TTG CAA AGA GCA GCC AGT GCT TTA AAC ATA ATT ATC AAT GCT ATA AGT ATT TGG AAT ACT
 2942 TCT CCA CCT AAC AAC AGC AGT TGA ATA TAA AAA ACG GAC AGG TAG CTT TAA TGA AGA TTT
 LEU HIS LEU THR THR ALA VAL GLU TYR LYS LYS ARG THR GLY SER PHE ASN GLU ASP LEU
 CTC CAC CTA ACA ACA GCA GTT GAA TAT AAA AAA CCG ACA GGT AGC TTT AAT GAA GAT TTG
 3002 LEU HIS HIS MET SER PRO LEU GLY TRP GLU HIS ILE ASN LEU LEU GLY GLU TYR HIS PHE
 TTA CAC CAT ATG TCG CCC TTA GGT TGG GAA CAT ATT AAT TTA CTA GGA GAA TAC CAT TTT
 3062 ASN SER GLU LYS VAL SER LEU ASN SER LEU ARG PRO LEU LYS LEU SER
 AAC TCA GAG AAA GTA GTC TCA TTA AAT TCT TTA AGA CCA CTA AAA CTT TCT TAA CGT TG
 3121 TTA AAA ACG AGG GAT TCG TCA GGA AAA TAG GCT TAG CGT TGT AAA TCC GCA TTT TCC TGA
 3181 CGC TAC CCC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

LISTE DES SEQUENCES : II

Saci

GAGCTCTTCCTTCAACGCACCTTCTGTACCAAGAGTTGTTGTC 42
 CATTGATCACTAACAATAGCTTCCCCTGCTTCTTCAAGCCCTTTGTACATAAAATCGTTAGATTTTCA 111
 TCATAAAAATACGAGAAAGACACAGGAAGACCGCAATTTTCTTTTCTTTCTTAGTACACTGAATG 180
 TAACCTTAAAGAAAAAGGAAAGGAAATGATGMAAAAAATGCGCTTTTATTTGGAGGG 244
 N S P E Y S V S L T S A A S V I Q A I D
 AATTCTCCAGAAATACTCAGTGTCTCACTAAGCTCAGCAGCAAGTGTGATCCAAAGCTATTGAC 304
 P L K Y E V M T I G I A P T M D W Y W Y
 CCGCTGAAATATGAAGTAATGACCATTGGCATCGCACCAACAATGGATTGGTATTTGGTAT 364
 Q G N L A N V R N D T W L E D H K N C H
 CAAGGAAACCTCGGGAATGTTCCGAATGATACTTGGCTAGAGATCACAACCAAACTGTCAC 424
 Q L T F S S Q G F I L G E K R I V P D V
 CAGCTGACTTTTCTAGCCCAAGGATTTATATAGGAGAAAAACGAATCGTCCCTGATGTC 484
 L F P V L H G K Y G E D G C I Q G L L E
 CTCTTCCAGTCTTGCAATGGAGATGCGCGAGGATGCGTGTATCCAAAGGACTGCTTGAA 544
 L M N L P Y V G C H V A A S A L C M N K
 CTAATGAACCTGCCTTATGTTGGTTGCCATGTGCGTCCCTCCGCTTATGATGAACAAA 604
 W L L H Q L A D T M G I A S A P T L L L
 TGGCTCTTGCACTCAACTTGCTGATACCATGGGAATCGCTAGTGTCTCCCACTTTGCTTTTA 664
 S R Y E N D P A T I D R F I Q D H G F P
 TCCCGCTATGAACGATCCTGCCACAATCGATCGTTTTTATTCAAGACCATGGATTCCCG 724

I F I K P N E A G S S K G I T K V T D K
ATCTTTATCAAGCCGAATGAAGCCGGTCTTCAAAAGGGGATCACAAAAGTAAGTAACTGACAAA
784

T A L Q S A L T T A F A Y G S T V L I Q
ACAGCGCTCCAATCTGCATTAACGACTGCTTTGCTTACGGTTCTACTGTGTGATCCAA
844

K A I A G I E I G C G I L G N E Q L T I
AAGCGATAGCGGGTATTGAATTTGGCTCGGCATCTTAGGAAATGAGCAATTGACGATT
904

G A C D A I S L V D G F F D F E E K Y Q
GGTGCTGTGATGCGATTCTCTTGTGCGACGGTTTTTTTGATTTTGAAGAGAAATACCAA
964

L I S A T I T V P A P L P L A L E S Q I
TTAATCAGCGCCACGATCAGTGTCCAGCACCATTTGCCCTCTCGGCTTGAATCAGATC
1024

K E Q A Q L L Y R N L G L T G L A R I D
AAGGAGCAGGCACAGCTGCTTTATCGAAACTTGGATGACGGGTCTGGCTCGAATCGAT
1084

F F V T N Q G A I Y L N E I N T M P G F
TTTTTCGTACCAATCAAGGAGCGGATTATTATTAACGAAATCAACACCATGCCGGGATTT
1144

T G H S R Y P A M M A E V G L S Y E I L
ACTGGGCACTCCCGCTACCCAGCTATGATGGCGGAAGTCGGGTTATCCTACGAAATATTA
1204

V E Q L E A L A E E D K R *
GTAGAGCAATTGATTGCACCTGGCAGAGGAGGACAAACGATGAACACATTACAATTGATCAATA
1267

AAAACCATCCATTGAAAAAAATCAAGAGCCCCCGCACTTAGTGCTCCTTTTAGCGATCAGCATG
1336

TTTACCTGCAG
Pst I
1347

R E V E N D I C A T I O N S

1/ Composition de polypeptides, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une protéine ou partie de protéine choisie parmi les séquences d'acides aminés identifiées dans la liste des séquences par SED ID NO 1 (VanH), SEQ ID NO 2 (VanA), SEQ ID NO 3 (VanX) ou SEQ ID NO 19 (VanC), ou toute protéine ou partie de protéine reconnue par les anticorps dirigés contre VanH, VanA, VanX ou VanC, ou toute protéine ou partie de protéine codée par une séquence hybridant avec l'un des enchaînements nucléotidiques identifiés dans la liste des séquences par SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10 ou SEQ ID NO 21 ou avec l'une des séquences V1 ou V2 suivantes dans des conditions stringentes ou peu stringentes :

V1 : GGX GAA GAT GGX TCX TTX CAA GGX

G C AG C G
A

V2 : AAT ACX ATX CCX GGX TTT AC

C T C
C

2/ Composition de polypeptides selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 3 protéines ou toute partie de l'une ou plusieurs de ces protéines nécessaires pour conférer à des bactéries à Gram-positif, la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ou de favoriser cette résistance, en particulier dans des souches de la famille des cocci à Gram-positif, ces protéines ou parties de protéines étant

a) soit reconnues par des anticorps dirigés contre l'une des séquences identifiées dans la liste des

FEUILLE DE REMPLACEMENT

séquences par SEQ ID NO 1 (VanH), SEQ ID NO 2 (VanA), SEQ ID NO 3 (VanX),

- b) soit codées par des gènes comportant une séquence identifiée par SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9 ou SEQ ID NO 10 ou hybridant avec l'une de ces séquences ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes ou peu stringentes ou avec les séquences V1 ou V2.

3/ Composition de polypeptides selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle correspond à l'association des protéines désignées par SEQ ID NO 1 (VanH), SEQ ID NO 2 (VanA), SEQ ID NO 3 (VanX).

4/ Composition de polypeptides selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisée en ce que la protéine VanC correspondant à la séquence SEQ ID NO 19 remplace la protéine VanA correspondant à la séquence SEQ ID NO 2.

5/ Composition de polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les séquences d'acides aminés nécessaires à l'expression de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, en particulier à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, sont sous le contrôle d'éléments de régulation, notamment des protéines correspondant aux séquences désignées par SEQ ID NO 4 (VanR) ou SEQ ID NO 5 (VanS) dans la liste des séquences.

6/ Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est codée par l'une des séquences SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 22 identifiées dans la liste des séquences.

7/ Protéine purifiée caractérisée en ce qu'elle correspond à la séquence SEQ ID NO 2 (VanA) ou à la séquence SEQ ID NO 19 (VanC), contenues dans la

composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

8/ Protéine caractérisée en ce qu'elle correspond à l'une des séquences identifiées par SEQ ID NO 1 (VanH), SEQ ID NO 3 (VanX), SEQ ID NO 4 (VanR), SEQ ID NO 5 (VanS).

9/ Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle code pour une séquence d'acides aminés selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, ou en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ADN complémentaire ou d'une séquence d'ARN correspondante.

10/ Séquence nucléotidique de 7,3 kb environ, correspondant au fragment de restriction HindIII-EcoRI tel qu'obtenu à partir du plasmide pIP816, comprenant ce fragment HindIII-EcoRI ou toute partie de ce fragment, en particulier le fragment de 3,4 kb EcoRI-XbaI, le fragment d'environ 1,7 kb EcoRV-SacII et le fragment de 3,3 kb HindIII-EcoRI.

11/ Séquence nucléotidique selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comporte dans l'ordre les sites de restriction suivants tel qu'obtenus à partir du plasmide pIP816 :

HindIII, BglII, BglII, EcoRI, BamHI, XbaI, EcoRI

12/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisée en ce qu'elle correspond à l'un des enchaînements identifiés par SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 22, ou en ce qu'elle comprend un de ces enchaînements ou toute partie de l'un de ces enchaînements, ou encore tout enchaînement ou partie d'enchaînement d'ADN complémentaire, ou tout enchaînement d'ARN correspondant à l'un de ces ADN, susceptible

- soit de constituer une sonde d'hybridation ou une amorce, pour la détection d'une résistance à des

FEUILLE DE REMPLACEMENT

antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, en particulier dans des souches de la famille des cocci à Gram-positif,

- soit de coder pour une séquence nécessaire à l'expression ou la régulation de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine et/ou la teicoplanine, en particulier dans des souches de la famille des cocci à Gram-positif.

13/ Séquence nucléotidique selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend ou en ce qu'elle correspond à l'un des enchaînements suivants :

V1 : GGX GAA GAT GGX TCX TTX CAA GGX

G C AG C G

A

V2 : AAT ACX ATX CCX GGX TTT AC

C T C

C

14/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'il s'agit de l'un des enchaînements SEQ ID NO 8 (vanA), SEQ ID NO 9 (vanH), SEQ ID NO 10 (vanX), SEQ ID NO 21 (vanC), SEQ ID NO 12(transposase), SEQ ID NO 13(résolvase), SEQ ID NO 14(vanY), SEQ ID NO 15(vanZ), SEQ ID NO 23(vanR), SEQ ID NO 24(vanS) ou d'une variante de l'un de ces enchaînements dès lors qu'elle code pour une protéine ayant des propriétés immunologiques et/ou fonctionnelles similaires à celles des protéines codées par les enchaînements SEQ ID NO 8 (vanA), SEQ ID NO 9 (vanH), SEQ ID NO 10 (vanX), SEQ ID NO 21 (vanC) SEQ ID NO 12(transposase), SEQ ID NO 13(résolvase), SEQ ID NO 14(vanY), SEQ ID NO 15(vanZ), SEQ ID NO 23(vanR), SEQ ID NO 24(vanS) , ou d's lors qu'elle permet la

détection de souches résistantes à des antibiotiques de la famille des glycopeptides.

15/ Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisée en ce qu'elle correspond à l'enchaînement SEQ ID NO 6 ou à l'enchaînement SEQ ID NO 22 ou en ce qu'elle comprend cet enchaînement.

16/ Séquence recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, sous le contrôle d'éléments de régulation susceptibles d'intervenir dans l'expression, de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine ou la teicoplanine, chez un hôte déterminé.

17/ Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 9 à 16, en un site non essentiel pour sa répllication, sous le contrôle d'éléments de régulation susceptibles d'intervenir dans l'expression, de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine ou la teicoplanine, chez un hôte déterminé.

18/ Vecteur recombinant selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pAT214.

19/ Hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 9 à 16 ou un vecteur selon la revendication 17 ou la revendication 18, dans des conditions permettant l'expression de la résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine ou la teicoplanine, cet hôte étant par exemple choisi parmi les bactéries, notamment les cocci à Gram-positif.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

20/ Sonde nucléotidique, caractérisée en ce qu'il s'agit d'ADN ou d'ARN et en ce qu'elle est capable d'hybrider avec une séquence selon l'une quelconque des revendications 9 à 15, cette sonde étant le cas échéant marquée, par exemple en ce qu'il s'agit de l'un des nucléotides :

V1 : GGX GAA GAT GGX TCX TTX CAA GGX
 G C AG C G
 A

ou

V2 : AAT ACX ATX CCX GGX TTT AC
 C T C
 C

21/ Sonde nucléotidique selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est spécifique chez des bactéries à Gram-positif, des séquences codant pour une protéine de résistance à des glycopeptides notamment à la vancomycine et/ou à la teicoplanine et universelle parmi ces séquences.

22/ Sonde nucléotidique selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle est spécifique d'une séquence nucléotidique codant pour une protéine nécessaire à l'expression d'un haut niveau de résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, en particulier à la vancomycine et à la teicoplanine, chez des bactéries à Gram-positif.

23/ Sonde nucléotidique selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle est spécifique d'une séquence nucléotidique codant pour une protéine nécessaire à l'expression d'un bas niveau de résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, chez des bactéries à Gram-positif.

24/ Sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 20 à 23, caractérisée en ce qu'elle hybride avec une séquence nucléotidique non chromosomique d'une souche résistante à des glycopeptides, notamment la vancomycine et/ou la teicoplanine, en particulier en ce qu'elle hybride avec une séquence nucléotidique non chromosomique d'une souche de cocci Gram-positif, par exemple une souche d'entérocoque et de préférence E. faecium 4147.

25/ Anticorps polyclonaux ou monoclonaux, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou une séquence d'acides aminés selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8.

26/ Kit pour le diagnostic in vitro sur un échantillon biologique, de la présence de souches résistantes aux glycopeptides, en particulier à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier aux cocci à Gram-positif, notamment en ce qu'il s'agit des souches d'entérocoques, par exemple E. faecium, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des anticorps selon la revendication 25, le cas échéant marqués,
- un réactif pour la détection d'une réaction immunologique du type anticorps-antigène,
- le cas échéant des réactifs pour effectuer la lyse des cellules de l'échantillon testé.

27/ Kit pour le diagnostic in vitro de la présence de souches résistantes aux glycopeptides, en particulier résistantes à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier aux cocci à Gram-positif notamment en ce qu'il s'agit de souches d'entérocoques, par exemple E. faecium, caractérisé en ce qu'il comprend :

FEUILLE DE REMPLACEMENT

- une sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, et le cas échéant,
- des oligonucléosides triphosphates dATP, dCTP, dTTP, dGTP,
- un agent de polymérisation d'ADN.

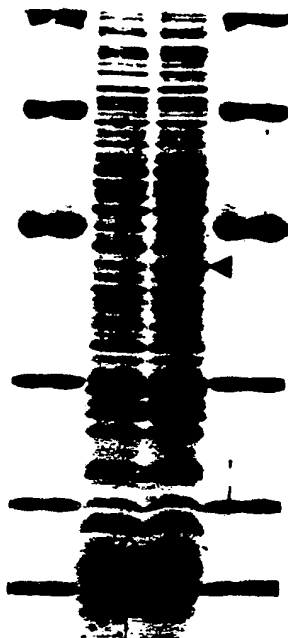
28/ Procédé de détection in vitro de la présence de souches résistantes aux glycopeptides, en particulier à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier à la famille des cocci Gram-positif, notamment en ce qu'il s'agit de souches d'entérocoques, par exemple E. faecium ou E.gallinarum, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique susceptible de contenir les souches résistantes, avec une amorce constituée par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, capable d'hybrider avec une séquence nucléotidique recherchée, nécessaire à l'expression de la résistance, cette séquence étant utilisée comme matrice, en présence des 4 différents nucléosides triphosphates, et d'un agent de polymérisation, dans des conditions d'hybridation telles que pour chaque séquence nucléotidique ayant hybridé avec une amorce, un produit d'élongation de chaque amorce complémentaire de la matrice est synthétisé,
- b) la séparation de la matrice et du produit d'élongation obtenu, ce dernier pouvant alors également se comporter comme une matrice,
- c) la répétition de l'étape a) de façon à obtenir une quantité détectable des séquences nucléotidiques recherchées,
- d) la détection du produit d'amplification des séquences nucléotidiques.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 1

1 2 3 4



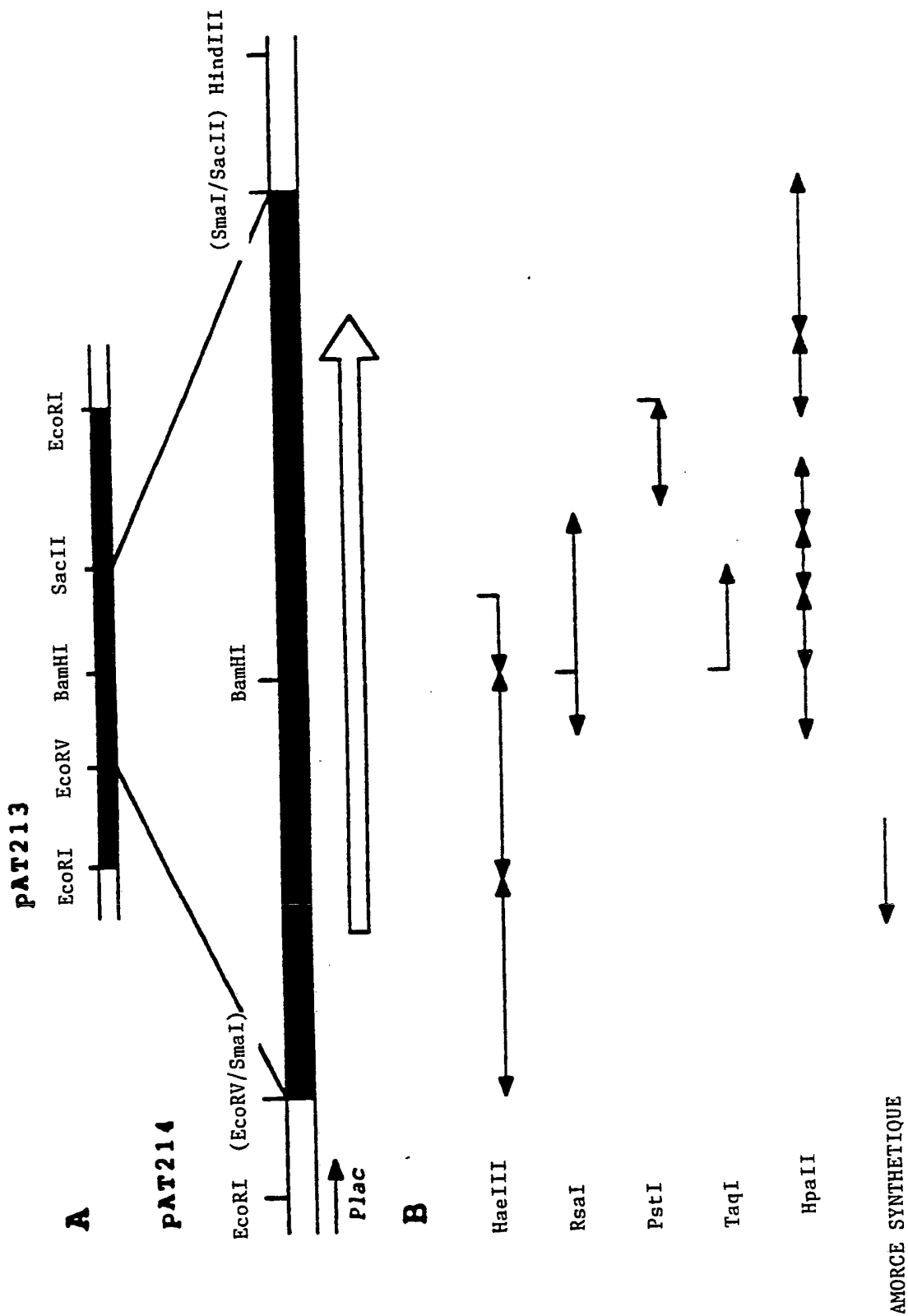
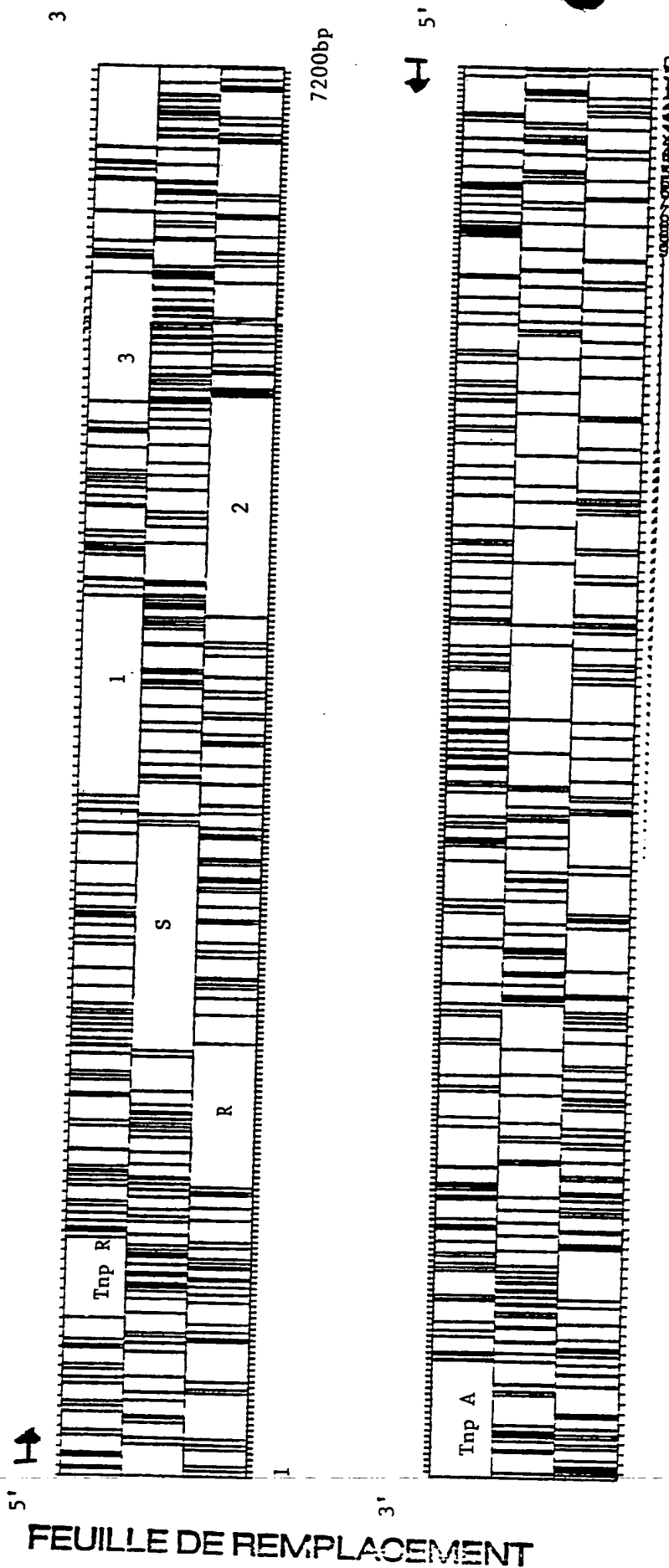


FIGURE 2

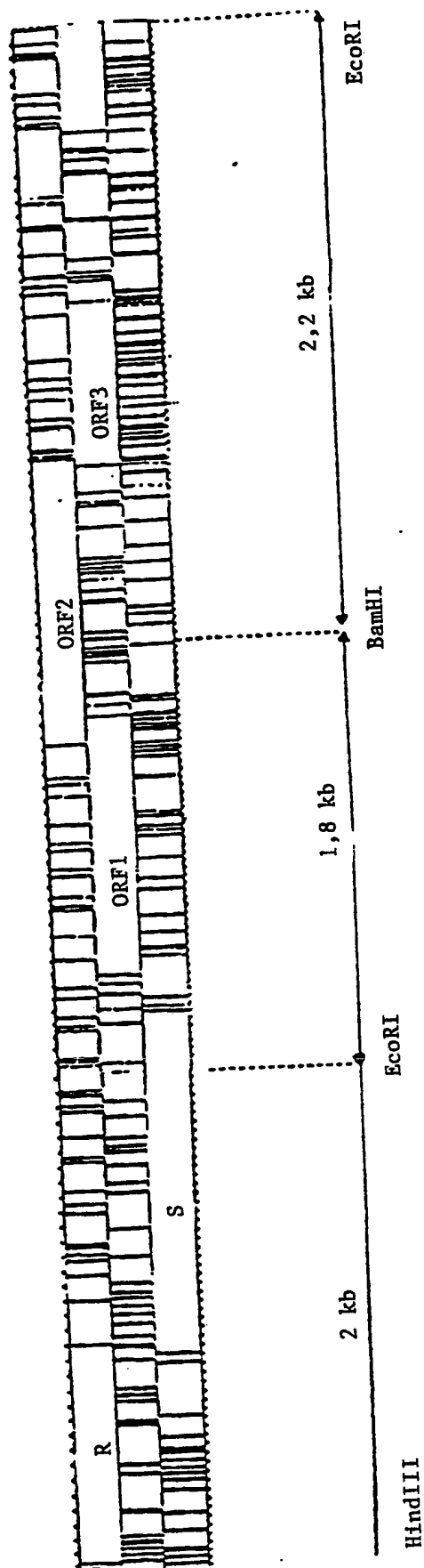
FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 3 (1/2)



FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 3 (2/2)



AAGCTTTTCTTTTGCTCATTTGTTAGAGATTTACTAACCGTATTAAATAGCTTCTTTTC
AGCCATTGCCCTTGCTTCCACACCATTTCTTCAAGTGTAGTAGCAGGCGATATAAT
TTTGTTTTCTTAGAAATCTATGCATTCATGCGATGATGATGCGATGATGATGATGAT
CAAGCTAATTGATGAAGGTACTTAAATGTCATTCGATATTCAGTCAAGGTAAGATTTC
AAAGTCGTATTCACCTCGAATTTCTTCAATGATCCCAAGTGTATTTCCCTTTGAGG
ATAATGATCAAGCGAGGATGGACTAACACCAATCTGTTTCGATATATATTTGATGACCGA
ATCTGGGATGCTTTTGATATGAGTGTATGGCCAACCGGATACCGAAGAACGCTAATTG
AACAGCAAAATCCTAAACGGTTTCTTCCCTCCATTCATCTTCAGGGATTTGCAATAAGC
TTTGGAAAAGTGAGTAGGTCCCAATTCATCTCCCTTCGCTTATTAACTATTCTAAATCCCG
CTGTCTCTGTTCGGGTGAAGCAATTCCTACCTCTCGCAATTTTCATTCAGTATCATTC
CATTCTGTATTTTCAATTTATAGTTCATTTATATATCAATAGAGTGTACTCTATTGAT
ACAAATGTAGTAGACTGATAAATCATAGTTAAGAGCGTCTCATAGAGCTTGTCTCAAA
ATGAGGTGATATTTGCGGAATTCGGTTATATTGCTGTGATGATGATGATGATGATGAT
TTCAAGACAAATTCAGCAGTTGAACGAGATCGGAATGGATATATATAAGAGAAAGTTT
CAGGAGCAACAAGGATCGCGAGCAACTTCAAAAGTGTAGACGATTTACAGGAAGATG
ACATCATTTAAGTTACAGACTTAACCTCGAATCACTCGTAGTACACAGATCATTTGAT
TAATCGATAACATACGAGATATAAAGGCAAGTTTAAATCACTAAAGATACATGGCTTG
ATTTATCAGAGGATATCCATACAGCCCAATTTCTAATTACTGTAGTGGTGTAAACC
AATTAGAGCGAGATCTTATTCGGATGAGACACGTAAGGATTTGAATGGCTAAGAAAG
AAGGAAAGTTTAAAGGTGATTAAGAGATATCATATAAATCACGCAAGGATGAATTATG
CGGXAAAGCTATATAAGAGGAAATATGACTGTAAATCAAAATTTGTGAATTACTAAT
GTATCTAGGCTTCAATATACAGGAAATATCAGAGTGAATAATTAGCCATTCTGTATT
CCGCTAATGGGCAATATTTTAAAGAGAAAGGAACTATAAATATAACAGCCCTCT
AGCGATGCCGAAAGCCCTTTTGATATAAAGGAAATCATCTTAAGAAATCTTAGTCA
TTTATTATGTAAATGCTTATAAATTCGGCCCTATAATCTGATAAATTATTAGGGCAAC

Fig. 4 (1/5)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

TTATGTGAAGGGTGATAACTATGAGCGGATAAAATACTTATTGTGGATGATGAACATGAA
ATTGCCGATTGGTTGAATTATACCTTAAACGAGAAATTATACGGTTTCAAAATACTAT
ACGCCAAAGAGCATTGGAAATGATAGACAAGCTGAGATTGACCTTGCCATATTGGAC
ATCATGCTTCCCGCACAGCGGCTTACTATCTGTCAAAAATAAGGGACAGCACACC
TATCCGATTATCATGCTGACCGGGAAGATACAGAGGTAGATAAAATTACAGGGTTAACA
ATCGCGCGGATGATTATATACGAAGCCCTTTCGCCCACTGGAGTTAATTGCTCGGGTA
AAGGCCAGTTGCGCGGATACAAAATTCAGTGGAGTAAGGAGCAGAACGAAATGTT
ATCGTCCACTCCGGCTTGTCTATTAAATGTTAACACCCCAAGAGTGTATCTGAACGAGAG
CAGTTATCCCTTACTCCGAGCTGCTATTTCATGAGATATGGGCGACGATAATTCAGCAAG
AATGTGGTTAGCTCCGAGCTGCTATTTCATGAGATATGGCGAATAATGAACGACACCAT
AGCAACAACACCATCACCGTGCTATCCGGCATTCGCGAATAATGAATAAATAA
GATAATCCGAATATATAAAGCGGATGGGGTTGGTTATAAATGAAATATGTTGGT
AAACGACTATTCGAACCTAGAACGAAACTTTACATGTATATCGTTSCAATTGTTGGAT
AGCAATTGTATTCGTGTTGTATATTCGTTCAATGATCCGAGGGAACTTGGGATTGATCA
CTTAAGTATTTGGAAACAATAATGACTTAATCACCTGGACGCGATGAAATTATATCT
ATATTCCATACGGAAACAATATAGATATCTTTATTTATGTGGCGATTGTCATTAGTATCT
TATTCTATGTGCGGTCATGCTTTCAAAATTCGCAAAATACCTTGACGAGATAAATACCGG
CATTGATGTACTTATTCAGAACGAAGATAACAATTCGAGCTTTCGCGAAATGGATGT
TATGGAAACAAGCTCAACACATTAACAGGACTTCGAAAGCGAGAGCAGGATGCAAA
GCTGGCCGAACAAGAAATGACGTTGTATGTACTTGGCGCAGGATTAATAACGCC
CCTTACATCCATTATCGGTTATTTGAGCCCTGCTTGACGAGGCTCCAGACATGCCGGTAGA
TCAAAAGGCAAGTATGTGCATATCACGTTCGACAAAGCGTATCGACTCGAACAGCTAAT
CGACGAGTTTGTGAGATTACACGGTATAACCTACAAAGGATACGCTAACAAAACGCA
CATAGACCTATACATATGCTGGTGCAGATGACCGATGAATTTATCTCAGCTTCCGC
ACATGGAAACAGGCGTTATTCAGGCCCGGAGGATCTGACCGTGTCCGGCGACCTGA

Fig. 4 (2/5)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

TAACTCGGAGAGTCTTTAACAAACATTTTGAAACGCGCTGCATACAGTGAGGATAA
CAGCATCATTGACATTACCGGGGCTCTCCGGGATGTGGTGTCAATCGAATTCAGAGAA
CACTGGAAGCATCCCAAAGATAGCTAGCTGCCATATTTGAAAGTTCTATAGGCTGGA
CAATTCTCGTTCTCCGATACGGGTGGCGGGACTTGGATTGGCGATTGCAAAAGAAAT
TATTGTTTCAGCATGGAGGCGAGATTTACGGGGAAGCTATGATAACTATACGACGTTTAG
GGTAGAGCTTCCAGGATGCCAGACTTGGTTGATAAAGGAGGTCCCTAAGAGATGTATAT
AATTTTTCAGGAAATCTCAAGGTTATCTTTACTTTTCTTAGGAAATTAACAAATTTAAT
ATTAGAAACGGCTCGTTCTTACAGGTAGACTTAATACCGTAGAAGACGAGCCGTTTTCG
TCTTCAGAGAAAGATTTGACAAAGATTACCAATGGCATCCCGTTTATTTGGTGCCTTT
CACAGAAAGGTTGGTCTTAATTAAGAAATACATCGGCATTACGTGTTATGGATGTGAGC
AGGATGAGGCGAGATGCATTCATGCTCTTTCCGCTCGCTTTGGCGTTATGGCAACGATAA
TTAACGCCAACGTCGGATCCAACGCCAATCCGGCGCTTTCAATCAATGATCAGTG
TGGGACATAAATCAGAGATTTCCGCCCTCTTCTTGGCTGAGAGAGCCGGTGTGA
AATATATTTCTACCCGAAGCATCGGCTGCAATCATATAGATACAACTGCTGCTAAGAGAA
TGGGCATCACTGTCGACAAATGTGGCTACTCGCCGGATAGCGTTGCCGATTATACTATGA
TGCTAATTTCTTATGGCAGTACGCAACGTAAATCGATTGTGCGCTCTGTGGAACACATG
ATTTTCAGGTTGGACAGCGACCGTGGCAAGGTACTCAGCGACATGACAGTTGGTGTGGTGG
GAACGGGCCAGATAGGCAAGCGGTTATGAGCGGCTGCGAGGATTTGGATGTAAGTGT
TGGCTTATAGTCGAGCGCGAAGTATAGAGGTAAACTATGTACCGTTTGATGAGTTGCTGC
AAAATAGCGATATCGTTACGCTTCATGTGCCGCTCAATACGGATACGCACTATATTATCA
GCCACGAACAATACAGAGAAATGAGCAAGGAGCATTTCTTATCAATACCTGGCGCGGTC
CACTTGATAGTACCTATGAGTTGGTTAAGCATTAGAAACGGGAACCTGGCGGGTGC
CATTGGATGTATTGGAAGGAGAGGAGAGTTTCTTACTCTGATTGCACCCAAACCA
TTGATAATCAATTTTACTTAACCTCAAGGATGCCCTAACGTGATAATCACACCGCAT
CGGCCATTATACCGAGCAAGCGTTGCGTGATACCGTTGAAACCAACCATTAACAACTGTT

Fig. 4 (3/5)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

TGGATTTTGAAAGGAGACAGGAGCATGAATAGAAATAAAGTTGCAATACTGTTGGGGGT
TGCTCAGAGGAGCATGACGTATCGGTAAATCTGCAATAGAGATAGCCGCTAACATTAAAT
-AAGGAAATACGAGCCGTATACATTGGAATTACGAATCTGGTGTATGGAATAATGTGC
GAAAACCTTGCGGGAATGGGAAACGACAAATGCTATTCAGCTGTACTCTCGCCGGAT
AAAAAATGCACGGATTACTTGTTAAAGAACCATGAATATGAATCAACCATGTTGAT
GTAGCATTTCAGCTTTGTCATGCGAAGTCAGGTGAAGATGGATCCATACAGGTCTGTTT
GAATTGTCGGTATCCCTTTTGTAAGCTGCGATATTCAGAGCTCAGCAATTTGTATGGAC
AAATCGTTGACATACATCGTTGCGAATAATGCTGGATAGCTACTCCCGCTTTTGGGT
ATTAATAAGSATGATAGGCCGGTGGCAGCTACGTTACCTATCCTGTTTGTAAAGCCG
GCGCTTCAGGCTCATCTTCGGTGTGAATAAAGTCAATAGCGCGGACGAAATGGACTAC
GCAATTGAATCGGCAGACAAATATGACAGCAAAATCTTAATTGAGCAGGCTGTTTCGGGC
TGTGAGGTCGGTTGTGCGGTATTGGGAACAGTGCCGCTTAGTTGTTGGCAGGTTGGAC
CAATCAGGCTGCAGTACGGAATCTTTCGTATTCATCAGGAAGTCGAGCCGGAAAGGC
TCTGAAACGGCAGTTATAACCGTTCCCGCAGACCTTTCAGCAGAGGAGCGAGGACGGATA
CAGGAAACGGCAGATAACGGCCGCTATGATGGCCGCTGAGAGGCTAGCCCGTGTGGAT
ATGTTTTCACAGATACGGCCGCTATGATGGCCGCTGAGAGTCAATACTGCCCCGGTTTC
ACGTCATACAGTCGTATACCGCTTACGCTTAAGGGGTGATAGGCATGGAAATAGGATTACTT
ATTGACCCTTGATCGTATTAGCGTTAAGGGGTGATAGGCATGGAAATAGGATTACTT
TTTTAGATGAATAGTACACGGTGTTCGTTGGGACGCTAAATATGCCACTTGGGATAATT
TCACCGGAAACCGGTTGACGGTTATGAAGTAAATCGCATTTGAGGACATACGAGTTGG
CTGAATCGCTTTTGAGGCAAAAGACTGGCTGCTACCCAGGGTACGGATTGCTTCTAT
GEGACGGTTACCGTCCTAAGCGTGCTGTAACTGTTTATGCAATGGGCTGCACAGCCGG
AAAAATAACCTGACAAAGGAAGTTATTATCCCAATATTGACCGAATGAGATGATTCA
AAGGATACGTGGCTTCAAAATCAAGCCATAGCCGCGCAGTGCCTTACGCTT
ATCGATTAGACACGGGTGAGCTTGTACCAATGGGAGCCGATTGATTTTATGGATGAAC

Fig. 4 (4/5)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

GCTCTCATGCGGCAAAATGGAAATATCATGCAATGAAGCGCAAAATCGCAGACGTTTGC
GCTCCATCATGGAAACAGTGGGTTTGAGGCATATAGCCTCGAATGGTGGCACTATGTAT
TAAGAGACGACCAATACCCCAATAGCTATTTGATTTCCCGTTAAATAAATTTTAACC
GTTGCACGGACAATATATAGTAGATAGTATTTGAGGATGTAAGGCAGAGCGATATGTC
GTTCTTAGGGAAATTTATATATAGTAGATAGCTTCTTGGCAGGAACCCGACGTATGTAACG
GGTCATTATCTGCGTGGCTGCGCAAGATAGCCTGATATAAGACTGATCGCATAGAGG
GGTGGTATTTACACCGCCCATTTGTCAACAGGCAGTTAGCCTCGTTAAATTCAGCATGG
GTATCACTTATGAATAATTCATCTACATTTGGTGATAATAGTAAATCCAGTAGGGCGAATA
ATTGACTGTAAATTTACGGGGCAAAACGGCACAACTCAACGAGATTGTGCGTTTAAGG
GGAAGATTCTAGAAATATTTCACTACTTCCAACTATATAGTTAAGGAGGAGACTGAATAATG
AAGAAGTTGTTTTTTTATTGTTATTCTTAATAATACTTAGGTTATGACTACGTT
AATGAAGCAGCTGTTTTCTCAGGAAAGTCTGAATTTCAAAATTAATGATCAAAATCCCAA
GAACATTTAGAAATAGTGGACTTCTGAAATACCCAGAGAAACAAATACAGAGAA
CAGGTTTATCAAGGAATCTGCTATTAAATCAATAGTAATATCTGTTCCCAAGAGTG
TGAGTCAGATATCGTGAATTTATCTAAACATGACGAATTAATAATGGATACGGGTTGC
TTGATAGTAATATTTATATGTCAAAAGAAATAGCACAAATTTTCAGAGATGGTCAATG
ATGCTGTAAAGGTGGCTTAGTCAATTTATTAAATAGTGGCTATCGAGACTTTGATG
AGCAAGGTGCTTTACCAAGAAATGGGGCTGAGTATGCTTACCAAGAGTTATAGTG
AGCATAAATTCAGGTTTATCACTAGATGATGATCAAGCTTGACGAATGGAAACGAGCCC
CTGAAGGAAGTGGATAGAGAAATGCTTGGAAATACGGTTTCAATTTACGTTATCCAG
AGGACAAACAGAGTTAACAGGAATTC

Fig. 4 (5/5)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10/69

LysLeuPhePheLeuLeuIleCys***ArgPheThrAsnArgIleLys***LeuLeuPhe
SerPheSerPheCysSerPheValArgAspLeuLeuThrValLeuAsnSerPhePheSer
AlaPheLeuPheAlaHisLeuLeuGluIleTyr***ProTyr***IleAlaSerPheGln
AAGCTTTTCTTTTGCTCATTGTAGAGATTTACTAACCGTATTAAATAGCTTCTTTTC

SerHisCysProCysPheProHisHisSerPheLysCysSerAspSerArgGlnTyrAsn
AlaIleAlaLeuAlaSerHisThrIleLeuSerSerValValIleAlaGlySerIleIle
ProLeuProLeuLeuProThrProPhePheGlnVal*****GlnAlaVal***Phe
AGCCATTGCCCTTGCTTCCCACACCATTCTTTCAAGTGTAGTGATAGCAGGCAGTATAAT

100

PheValPheSer***LysIleTyrAlaPheMetGln***MetAsnGlyIleThrIlePhe
LeuPhePheLeuArgLysSerMetHisSerCysSerArg***MetAlaSerProPheSer
CysPhePheLeuGluAsnLeuCysIleHisAlaValAspGluTrpHisHisHisPhePro
TTTGTTTTTCTTAGAAAATCTATGCATTCATGCAGTAGATGAATGGCATCACCATTTTC

GlnSer***LeuMetLysValLeuLysCysHisSerIlePheThrGlnGlyLysSerTyr
LysAlaAsn*****ArgTyrLeuAsnValIleArgTyrSerLeuArgValLysValThr
LysLeuIleAspGluGlyThr***MetSerPheAspIleHisSerGly***LysLeuGln
CAAAGCTAATTGATGAAGGTACTTAAATGTCATTCGATATTCACCTCAGGGTAAAAGTTAC

200

LysValValPheThrSerAsnPhePheGlnMetIleProLysCysIlePheProLeuArg
LysSerTyrSerLeuArgIleSerPheLys***SerGlnSerValPheSerLeu***Gly
SerArgIleHisPheGluPheLeuSerAsnAspProLysValTyrPheProPheGluAsp
AAAGTCGTATTCACCTCGAATTTCTTTCAAATGATCCCAAAGTGTATTTTCCCTTTGAGG

300

Fig. 5 (1/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

11/69

IleMetIleLysArgGlyTrpThrAsnThrAsnLeuPheArgTyrIleLeuTyrAspArg
*****SerSerGluAspGlyLeuThrProIleCysPheAspIleTyrCysMetThrGlu
AsnAspGlnAlaArgMetAsp***HisGlnSerValSerIleTyrIleVal***ProAsn
ATAATGATCAAGCGAGGATGGACTAACACCAATCTGTTTCGATATATATTGTATGACCGA
.
.
.
.
.
IleTrpAspAlaPheAspMetSerValTrpProThrGlyIleProLysAsnSer***Leu
SerGlyMetLeuLeuIle***ValTyrGlyGlnProGlyTyrArgArgThrAlaAsn***
LeuGlyCysPhe***TyrGluCysMetAlaAsnArgAspThrGluGluGlnLeuIleGlu
ATCTGGGATGCTTTTGATATGAGTGTATGGCCAACCGGGATACCGAAGAACAGCTAATTG
.
.
.
400
AsnSerLysSer***ThrValPhePheProProSerLeuIleAsnTyrPhe***IlePro
ThrAlaAsnProLysArgPheSerSerLeuLeuArgLeuLeuThrIleSerLysSerArg
GlnGlnIleLeuAsnGlyPheLeuProSerPheAlaTyr***LeuPheLeuAsnProVal
AACAGCAAATCCTAAACGGTTTTCTTCCCTCCTTCGCTTATTAATACTATTTCTAAATCCCG
.
.
.
.
.
PheGlyLysSerGluValGlyProGlnTyrProPheIlePheArgAspLeuHisLysSer
LeuGluLysValLys***ValProSerIleHisSerSerSerGlyIleCysIleLysAla
TrpLysLys***SerArgSerProValSerIleHisLeuGlnGlyPheAla***LysPro
TTTGAAAAAGTGAAGTAGGTCCCCAGTATCCATTCATCTTCAGGGATTGCATAAAAGC
.
.
.
500
LeuSerLeuPheArgCysLysGlnPheSerThrSerArgAsnPheHisSerValSerPhe
CysLeuCysSerGlyValSerAsnSerLeuProLeuAlaIlePheIleGlnTyrHisSer
ValSerValProVal***AlaIleLeuTyrLeuSerGlnPheSerPheSerIleIlePro
CTGTCTCTGTTCCGGTGTAAAGCAATTCTCTACCTCTCGCAATTTTCATTTCAGTATCATTC
.
.
.
.
.
600

Fig. 5 (2/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

13/ 69

ThrSerPheMetLeuGlnThr***LeuGluSerLeuValValHisLysIleTyrLeuAsn
HisHisLeuCysTyrArgLeuAsnSerAsnHisSer***TyrThrArgSerIle***Ile
IleIleTyrValThrAspLeuThrArgIleThrArgSerThrGlnAspLeuPheGluLeu
ACATCATTATGTTACAGACTTAACTCGAATCACTCGTAGTACACAAGATCTATTTGAAT

SerIleThrTyrGluIleLysArgGlnValAsnHis***LysIleHisGlyLeu
AsnArg***HisThrArg***LysGlyLysPheLysIleThrLysArgTyrMetAla***
IleAspAsnIleArgAspLysLysAlaSerLeuLysSerLeuLysAspThrTrpLeuAsp
TAATCGATAACATACGAGATAAAAAGGCAAGTTTAAAATCACTAAAAGATACATGGCTTG

1000

IleTyrGlnLysIleIleHisThrAlaAsnSer***LeuLeu***TrpLeuValLeuThr
PheIleArgArg***SerIleGlnProIleLeuAsnTyrCysAsnGlyTrpCys***Pro
LeuSerGluAspAsnProTyrSerGlnPheLeuIleThrValMetAlaGlyValAsnGln
ATTTATCAGAAGATAATCCATACAGCCAATTCTTAATTACTGTAATGGCTGGTGTAAACC

Asn***SerGluIleLeuPheGly***AspAsnValLysGlyLeuAsnTrpLeuArgLys
IleArgAlaArgSerTyrSerAspGluThrThr***ArgAsp***IleGly***GluArg
LeuGluArgAspLeuIleArgMetArgGlnArgGluGlyIleGluLeuAlaLysLysGlu
AATTAGAGCGAGATCTTATTCGGATGAGACAACGTGAAGGGATTGAATTGGCTAAGAAAG

1100

LysGluSerLeuLysValAsp***ArgSerIleIleLysIleThrGlnGlu***IleMet
ArgLysVal***ArgSerIleLysGluValSer***LysSerArgArgAsnGluLeuCys
GlyLysPheLysGlyArgLeuLysLysTyrHisLysAsnHisAlaGlyMetAsnTyrAla
AAGGAAAGTTTAAAGGTCGATTAAAGAAGTATCATAAAAATCACGCAGGAATGAATTATG

1200

Fig. 5 (4/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

14/69

ArgArgLysLeuTyrLysGluGlyAsnMetThrValAsnGlnIleCysGluIleThrAsn
GlyGluSerTyrIleLysLysGluIle***Leu***IleLysPheValLysLeuLeuMet
AlaLysAlaIle***ArgArgLysTyrAspCysLysSerAsnLeu***AsnTyr***Cys
CGGXAAAGCTATATAAGAAGGAAATATGACTGTAAATCAAATTTGTGAAATTACTAAT
.
ValSerArgAlaSerLeuTyrArgLysLeuSerGluValAsnAsn***ProPheCysIle
TyrLeuGlyLeuHisTyrThrGlyAsnTyrGlnLys***IleIleSerHisSerValPhe
Ile***GlyPheIleIleGlnGluIleIleArgSerGlu***LeuAlaIleLeuTyrSer
GTATCTAGGGCTTCATTATACAGGAAATTATCAGAAGTGAATAATTAGCCATTCTGTATT
.
1300
ProLeuMetGlyAsnIlePheLysGluGluLysGluThrIleLysTyr***GlnProPro
Arg***TrpAlaIlePheLeuLysLysLysArgLysLeu***AsnIleAsnSerLeuLeu
AlaAsnGlyGlnTyrPhe***ArgArgLysGlyAsnTyrLysIleLeuThrAlaSer***
CCGCTAATGGGCAATATTTTTAAAGAAGAAAAGGAACTATAAATATTAACAGCCTCCT
.
SerAspAlaGluLysProPheAspLysLysArgIleIleIleLeuArgAsnSer***Ser
AlaMetProLysSerProLeuIleLysLysGluSerSerSer***GluIleLeuSerHis
ArgCysArgLysAlaLeu*****LysLysAsnHisHisLeuLysLysPheLeuValIle
AGCGATGCCGAAAAGCCCTTTGATAAAAAAGAATCATCATCTTAAGAAATTCTTAGTCA
.
1400
PheIleMet***MetLeuIleAsnSerAlaLeu***SerAspLysLeuLeuArgAlaAsn
LeuLeuCysLysCysLeu***IleArgProTyrAsnLeuIleAsnTyr***GlyGlnThr
TyrTyrValAsnAlaTyrLysPheGlyProIleIle*****IleIleLysGlyLysLeu
TTTATTATGTAAATGCTTATAAATTCGGCCCTATAATCTGATAAATTATTAAGGGCAAAC
.
1500

Fig. 5 (5/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

15/ 69

LeuCysGluArgValIleThrMetSerAspLysIleLeuIleValAspAspGluHisGlu
TyrValLysGly*****Leu***AlaIleLysTyrLeuLeuTrpMetMetAsnMetLys
Met***LysGlyAspAsnTyrGluArg***AsnThrTyrCysGly*****Thr***Asn
TTATGTGAAAGGGTGATAACTATGAGCGATAAAATACTTATTGTGGATGATGAACATGAA
IleAlaAspLeuValGluLeuTyrLeuLysAsnGluAsnTyrThrValPheLysTyrTyr
LeuProIleTrpLeuAsnTyrThr***LysThrArgIleIleArgPheSerAsnThrIle
CysArgPheGly***IleIleLeuLysLysArgGluLeuTyrGlyPheGlnIleLeuTyr
ATTGCCGATTTGGTTGAATTATACTTAAAAACGAGAATTATACGGTTTTCAAATACTAT

1600

ThrAlaLysGluAlaLeuGluCysIleAspLysSerGluIleAspLeuAlaIleLeuAsp
ProProLysLysHisTrpAsnVal***ThrSerLeuArgLeuThrLeuProTyrTrpThr
ArgGlnArgSerIleGlyMetTyrArgGlnVal***Asp***ProCysHisIleGlyHis
ACCGCCAAAGAAGCATTGGAATGTATAGACAAGTCTGAGATTGACCTTGCCATATTGGAC
IleMetLeuProGlyThrSerGlyLeuThrIleCysGlnLysIleArgAspLysHisThr
SerCysPheProAlaGlnAlaAlaLeuLeuSerValLysLys***GlyThrSerThrPro
HisAlaSerArgHisLysArgProTyrTyrLeuSerLysAsnLysGlyGlnAlaHisLeu
ATCATGCTTCCCGGCACAAGCGGCCTTACTATCTGTCAAAAATAAGGGACAAGCACACC

1700

TyrProIleIleMetLeuThrGlyLysAspThrGluValAspLysIleThrGlyLeuThr
IleArgLeuSerCys***ProGlyLysIleGlnArg***IleLysLeuGlnGly***Gln
SerAspTyrHisAlaAspArgGluArgTyrArgGlyArg***AsnTyrArgValAsnAsn
TATCCGATTATCATGCTGACCGGGAAAGATACAGAGGTAGATAAAATTACAGGGTTAACA

1800

Fig. 5 (6/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

16/ 69

IleGlyAlaAspAspTyrIleThrLysProPheArgProLeuGluLeuIleAlaArgVal
SerAlaArgMetIleIle***ArgSerProPheAlaHisTrpSer***LeuLeuGly***
ArgArgGly***LeuTyrAsnGluAlaLeuSerProThrGlyValAsnCysSerGlyLys
ATCGGCGCGGATGATTATATAACGAAGCCCTTTCGCCCCACTGCAGTTAATTGCTCGGGTA

LysAlaGlnLeuArgArgTyrLysLysPheSerGlyValLysGluGlnAsnGluAsnVal
ArgProSerCysAlaAspThrLysAsnSerValGlu***ArgSerArgThrLysMetLeu
GlyProValAlaProIleGlnLysIleGlnTrpSerLysGlyAlaGluArgLysCysTyr
AAGGCCCAGTTGCGCCGATACAAAAAATTCAGTGGAGTAAAGGAGCAGAACGAAAATGTT

1900

IleValHisSerGlyLeuValIleAsnValAsnThrHisGluCysTyrLeuAsnGluLys
SerSerThrProAlaLeuSerLeuMetLeuThrProMetSerValIle***ThrArgSer
ArgProLeuArgProCysHis***Cys***HisPro***ValLeuSerGluArgGluAla
ATCGTCCACTCCGGCCTTGTCATTAATGTTAACACCCATGAGTGTATCTGAACGAGAAG

GlnLeuSerLeuThrProThrGluPheSerIleLeuArgIleLeuCysGluAsnLysGly
SerTyrProLeuLeuProProSerPheGlnTyrCysGluSerSerValLysThrArgGly
ValIleProTyrSerHisArgValPheAsnThrAlaAsnProLeu***LysGlnGlyGlu
CAGTTATCCCTTACTCCCACCGAGTTTTCAATACTGCGAATCCTCTGTGAAAACAAGGGG

2000

AsnValValSerSerGluLeuLeuPheHisGluIleTrpGlyAspGluTyrPheSerLys
MetTrpLeuAlaProSerCysTyrPheMetArgTyrGlyAlaThrAsnIleSerAlaArg
CysGly***LeuArgAlaAlaIleSer***AspMetGlyArgArgIlePheGlnGlnGlu
AATGTGGTTAGCTCCGAGCTGCTATTTTCATGAGATATGGGGCGACGAATATTTTCAGCAAG

2100

Fig. 5 (7/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SerAsnAsnThrIleThrValHisIleArgHisLeuArgGluLysMetAsnAspThrIle
AlaThrThrProSerProCysIleSerGlyIleCysAlaLysLys***ThrThrProLeu
GlnGlnHisHisHisArgAlaTyrProAlaPheAlaArgLysAsnGluArgHisHis***
AGCAACAACACCATCACCGTGCATATCCGGCATTTCGCGCGAAAAAATGAACGACACCATT
.
.
.
.
.
AspAsnProLysTyrIleLysThrValTrpGlyValGlyTyrLysIleGluLys***Lys
IleIleArgAsnIle***LysArgTyrGlyGlyLeuValIleLysLeuLysAsnLysLys
SerGluIleTyrLysAsnGlyMetGlyGlyTrpLeuAsn***LysIleLysLys
GATAATCCGAAATATATAAAAACGGTATGGGGGGTTGGTTATAAAATTGAAAAATAAAAA
.
.
.
2200
LysArgLeuPheGlnThrArgThrLysThrLeuHisValTyrArgCysAsnCysCysGly
AsnAspTyrSerLysLeuGluArgLysLeuTyrMetTyrIleValAlaIleValValVal
ThrThrIleProAsn***AsnGluAsnPheThrCysIleSerLeuGlnLeuLeuTrp***
AAACGACTATTCCAACTAGAACGAAACTTTACATGTATATCCTTGCAATTGTTGTGGT
.
.
.
.
.
SerAsnCysIleArgValValTyrSerPheAsnAspProArgGluThrTrpGlyLeuAsp
AlaIleValPheValLeuTyrIleArgSerMetIleArgGlyLysLeuGlyAspTrpIle
GlnLeuTyrSerCysCysIlePheValGln***SerGluGlyAsnLeuGlyIleGlySer
AGCAATTGTATTCGTGTTGTATATTCGTTCAATGATCCGAGGGAACTTGGGGATTGGAT
.
2300
LeuLysTyrPheGlyLysGlnIle***LeuLysSerProGlyArgAspGluIleIleSer
LeuSerIleLeuGluAsnLysTyrAspLeuAsnHisLeuAspAlaMetLysLeuTyrGln
ValPheTrpLysThrAsnMetThrIleThrTrpThrArg***AsnTyrIleAsn
CTTAAGTATTTTGGAAAACAAATATGACTTAAATCACCTGGACGCGATGAAATTATATCA
.
.
.
.
.
2400

Fig. 5 (8/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

IlePheHisThrGluGlnTyrArgTyrLeuTyrLeuCysGlyAspCysHis***TyrSer
TyrSerIleArgAsnAsnIleAspIlePheIleTyrValAlaIleValIleSerIleLeu
IleProTyrGlyThrIle***IleSerLeuPheMetTrpArgLeuSerLeuValPheLeu
ATATTCCATACGGAACAATATAGATATCTTTATTTATGTGGCGATTGTCATTAGTATTCT
TyrSerMetSerArgHisAlaPheLysIleArgLysIleLeu***ArgAspLysTyrArg
IleLeuCysArgValMetLeuSerLysPheAlaLysTyrPheAspGluIleAsnThrGly
PheTyrValAlaSerCysPheGlnAsnSerGlnAsnThrLeuThrArg***IleProAla
TATTCTATGTCGCGTCATGCTTTCAAATTCGCAAATACTTTGACGAGATAAATACCGG
2500
His***CysThrTyrSerGluArgArg***ThrAsn***AlaPheCysGlyAsnGlyCys
IleAspValLeuIleGlnAsnGluAspLysGlnIleGluLeuSerAlaGluMetAspVal
LeuMetTyrLeuPheArgThrLysIleAsnLysLeuSerPheLeuArgLysTrpMetLeu
CATTGATGTACTTATTCAGAACGAAGATAAACAATTGAGCTTTCTGCGGAAATGGATGT
TyrGlyThrLysAlaGlnHisIleLysThrAspSerGlyLysAlaArgAlaGlyCysLys
MetGluGlnLysLeuAsnThrLeuLysArgThrLeuGluLysArgGluGlnAspAlaLys
TrpAsnLysSerSerThrHis***AsnGlyLeuTrpLysSerGluSerArgMetGlnSer
TATGGAACAAAAGCTCAACACATTAAAACGGACTCTGGAAAAGCGAGAGCAGGATGCAAA
2600
AlaGlyArgThrLysLysLys***ArgCysTyrValLeuGlyAlaArgTyr***AsnAla
LeuAlaGluGlnArgLysAsnAspValValMetTyrLeuAlaHisAspIleLysThrPro
TrpProAsnLysGluLysMetThrLeuLeuCysThrTrpArgThrIleLeuLysArgPro
GCTGGCCGAACAAAGAAAAAATGACGTTGTTATGTACTTGCGCACGATATTAACGCC
2700

Fig. 5 (9/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

19/ 69

ProTyrIleHisTyrArgLeuPheGluProAla***ArgGlySerArgHisAlaGlyArg
LeuThrSerIleIleGlyTyrLeuSerLeuLeuAspGluAlaProAspMetProValAsp
LeuHisProLeuSerValIle***AlaCysLeuThrArgLeuGlnThrCysArg***Ile
CCTTACATCCATTATCGGTTATTTGAGCCTGCTTGACGAGGCTCCAGACATGCCGGTAGA
.
SerLysGlyLysValCysAlaTyrHisValGlyGlnSerValSerThrArgThrAlaAsn
GlnLysAlaLysTyrValHisIleThrLeuAspLysAlaTyrArgLeuGluGlnLeuIle
LysArgGlnSerMetCysIleSerArgTrpThrLysArgIleAspSerAsnSer***Ser
TCAAAAGGCAAAGTATGTGCATATCACGTTGGACAAAGCGTATCGACTCGAACAGCTAAT
. 2800
ArgArgValPhe***AspTyrThrVal***ProThrAsnAspAsnAlaAsnLysAsnAla
AspGluPhePheGluIleThrArgTyrAsnLeuGlnThrIleThrLeuThrLysThrHis
ThrSerPheLeuArgLeuHisGlyIleThrTyrLysArg***Arg***GlnLysArgThr
CGACGAGTTTTTTGAGATTACACGGTATAACCTACAAACGATAACGCTAACAAAAACGCA
.
HisArgProIleLeuTyrAlaGlyAlaAspAspArg***IleLeuSerSerAlaPheArg
IleAspLeuTyrTyrMetLeuValGlnMetThrAspGluPheTyrProGlnLeuSerAla
ThrTyrThrIleCysTrpCysArgProMetAsnPheIleLeuSerPheProHis
CATAGACCTATACTATATGCTGGTGCAGATGACCGATGAATTTTATCCTCAGCTTTCCGC
. 2900
ThrTrpLysThrGlyGlyTyrSerArgProArgGlySerAspArgValArgArgPro***
HisGlyLysGlnAlaValIleHisAlaProGluAspLeuThrValSerGlyAspProAsp
MetGluAsnArgArgLeuPheThrProProArgIle***ProCysProAlaThrLeuIle
ACATGGAAAACAGGCGGTTATTCACGCCCCGAGGATCTGACCGTGTCCGGCGACCCTGA
. 3000

Fig. 5 (10/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

20/ 69

ThrArgGluSerLeuGlnHisPheGluLysArgArgCysIleGln***Gly***
LysLeuAlaArgValPheAsnAsnIleLeuLysAsnAlaAlaAlaTyrSerGluAspAsn
AsnSerArgGluSerLeuThrThrPhe***LysThrProLeuHisThrValArgIleThr
TAAACTCGCGAGAGTCTTTAACACATTTTGAAAAACGCCGCTGCATACAGTGAGGATAA

GlnHisHis***HisTyrArgGlyProLeuArgGlyCysGlyValAsnArgIleGlnGlu
SerIleIleAspIleThrAlaGlyLeuSerGlyAspValValSerIleGluPheLysAsn
AlaSerLeuThrLeuProArgAlaSerProGlyMetTrpCysGlnSerAsnSerArgThr
CAGCATCATTGACATTACCGCGGGCCTCTCCGGGGATGTGGTGTCAATCGAATTCAAGAA

3100

HisTrpLysHisProLysArg***AlaSerCysHisIle***LysValLeu***AlaGly
ThrGlySerIleProLysAspLysLeuAlaAlaIlePheGluLysPheTyrArgLeuAsp
LeuGluAlaSerGlnLysIleSer***LeuProTyrLeuLysSerSerIleGlyTrpThr
CACTGGAAGCATCCCAAAGATAAGCTAGCTGCCATATTTGAAAGTTCTATAGGCTGGA

GlnPheSerPhePheArgTyrGlyTrpArgGlyThrTrpIleGlyAspCysLysArgAsn
AsnSerArgSerSerAspThrGlyGlyAlaGlyLeuGlyLeuAlaIleAlaLysGluIle
IleLeuValLeuProIleArgValAlaArgAspLeuAspTrpArgLeuGlnLysLysLeu
CAATTCTCGTTCTTCCGATACGGGTGGCGCGGGACTTGGATTGGCGATTGCAAAGAAAT

3200

TyrCysSerAlaTrpArgAlaAspLeuArgGlyLysLeu*****LeuTyrAspVal***
IleValGlnHisGlyGlyGlnIleTyrAlaGluSerTyrAspAsnTyrThrThrPheArg
LeuPheSerMetGluGlyArgPheThrArgLysAlaMetIleThrIleArgArgLeuGly
TATTGTTTCAGCATGGAGGGCAGATTTACGCGGAAAGCTATGATAACTATACGACGTTTAG

3300

Fig. 5 (11/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

21/69

GlyArgAlaSerSerAspAlaArgLeuGly*****LysGluValLeuArgAspValTyr
ValGluLeuProAlaMetProAspLeuValAspLysArgArgSer***GluMetTyrIle
SerPheGlnArgCysGlnThrTrpLeuIleLysGlyGlyProLysArgCysIle
GGTAGAGCTTCCAGCGATGCCAGACTTGTTGATAAAAGGAGGTCCTAAGAGATGTATAT
.
AsnPheLeuGlyLysSerGlnGlyTyrLeuTyrPhePheLeuGlyAsn***GlnPheAsn
IlePhe***GluAsnLeuLysValIlePheThrPheSer***GluIleAsnAsnLeuIle
PhePheArgLysIleSerArgLeuSerLeuLeuPheLeuArgLysLeuThrIle***Tyr
AATTTTTTAGGAAAATCTCAAGGTTATCTTTACTTTTTCTTAGGAAATTAACAATTTAAT
.
3400
IleLysLysArgLeuValLeuThrArg***Thr***TyrArgLysAsnGluProPheSer
LeuArgAsnGlySerPheLeuHisGlyArgLeuAsnThrValArgThrSerArgPheArg
GluThrAlaArgSerTyrThrValAspLeuIleProGluArgAlaValPheVal
ATTAAGAAACGGCTCGTTCTTACACGGTAGACTTAATACCGTAAGAACGAGCCGTTTTTCG
.
PhePheArgGluArgPheAspLysIleThrIleGlyIleProValLeuPheGlyAlaPhe
SerSerGluLysAspLeuThrArgLeuProLeuAlaSerProPheTyrLeuValProPhe
LeuGlnArgLysIle***GlnAspTyrHisTrpHisProArgPheIleTrpCysLeuSer
TTCTTCAGAGAAAGATTTGACAAGATTACCATTGGCATCCCCGTTTTATTTGGTGCCTTT
.
3500
HisArgLysGlyTrpSer***Leu***IleThrSerAlaLeuLeuPheMetAspValSer
ThrGluArgValGlyLeuAsnTyrGlu***HisArgHisTyrCysLeuTrpMet***Ala
GlnLysGlyLeuValLeuIleMetAsnAsnIleGlyIleThrValTyrGlyCysGluGln
CACAGAAAGGGTTGGTCTTAATTATGAATAACATCGGCATTACTGTTTATGGATGTGAGC
.
3600

Fig. 5 (12/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

22/69

ArgMetArgGlnMetHisSerMetLeuPheArgLeuAlaLeuAlaLeuTrpGlnArg***
Gly***GlyArgCysIleProCysSerPheAlaSerLeuTrpArgTyrGlyAsnAspAsn
AspGluAlaAspAlaPheHisAlaLeuSerProArgPheGlyValMetAlaThrIleIle
AGGATGAGGCAGATGCATTCCATGCTCTTTTCGCCTCGCTTTTGCGTTATGGCAACGATAA

LeuThrProThrCysArgAsnProThrProAsnProArgLeuSerIleAsnValSerVal
***ArgGlnArgValGlyIleGlnArgGlnIleArgAlaPheGlnSerMetTyrGlnCys
AsnAlaAsnValSerGluSerAsnAlaLysSerAlaProPheAsnGlnCysIleSerVal
TTAACGCCAACGTGTCGGAATCCAACGCCAAATCCGCGCCTTCAATCAATGTATCAGTG

3700
TrpAspIleAsnGlnArgPheProProLeuPhePheLeuArg***ArgGluProVal***
GlyThr***IleArgAspPheArgLeuTyrSerSerCysAlaGluGluSerArgCysGlu
GlyHisLysSerGluIleSerAlaSerIleLeuLeuAlaLeuLysArgAlaGlyValLys
TGGGACATAAATCAGAGATTTCGCGCTCTATTCTTCTTGCGCTGAAGAGAGCCGGTGTGA

AsnIlePheLeuProGluAlaSerAlaAlaIleIle***IleGlnLeuLeuLeuArgGlu
IleTyrPheTyrProLysHisArgLeuGlnSerTyrArgTyrAsnCysCys***GluAsn
TyrIleSerThrArgSerIleGlyCysAsnHisIleAspThrThrAlaAlaLysArgMet
AATATATTTCTACCCGAAGCATCGGCTGCAATCATATAGATACAACTGCTGCTAAGAGAA

3800
TrpAlaSerLeuSerThrMetTrpArgThrArgArgIleAlaLeuProIleIleLeu**
GlyHisHisCysArgGlnCysGlyValLeuAlaGly***ArgCysArgLeuTyrTyrAsp
GlyIleThrValAspAsnValAlaTyrSerProAspSerValAlaAspTyrThrMetMet
TGGGCATCACTGTGACAATGTGGCGTACTCGCCGGATAGCGTTGCCGATTATACTATGA

Fig. 5 (13/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

23/ 69

Cys***PheLeuTrpGlnTyrAlaThr***AsnArgLeuCysAlaLeuTrpLysAsnMet
AlaAsnSerTyrGlySerThrGlnArgLysIleAspCysAlaLeuCysGlyLysThr***
LeuIleLeuMetAlaValArgAsnValLysSerIleValArgSerValGluLysHisAsp
TGCTAATTCTTATGGCAGTACGCAACGTAAAATCGATTGTGCGCTCTGTGAAAAACATG
.
IleSerGlyTrpThrAlaThrValAlaArgTyrSerAlaThr***GlnLeuValTrpTrp
PheGlnValGlyGlnArgProTrpGlnGlyThrGlnArgHisAspSerTrpCysGlyGly
PheArgLeuAspSerAspArgGlyLysValLeuSerAspMetThrValGlyValValGly
ATTCAGGTTGGACAGCGACCGTGGCAAGGTACTCAGCGACATGACAGTTGGTGTGGTGG
.
4000
GluArgAlaArg***AlaLysArgLeuLeuSerGlyCysGluAspLeuAspValLysCys
AsnGlyProAspArgGlnSerGlyTyr***AlaAlaAlaArgIleTrpMet***SerVal
ThrGlyGlnIleGlyLysAlaValIleGluArgLeuArgGlyPheGlyCysLysValLeu
GAACGGGCCAGATAGGCAAAGCGGTTATTGAGCGGCTGCGAGGATTTGGATGTAAAGTGT
.
TrpLeuIleValAlaAlaGluVal***Arg***ThrMetTyrArgLeuMetSerCysCys
GlyLeu***SerGlnProLysTyrArgGlyLysLeuCysThrVal*****ValAlaAla
AlaTyrSerArgSerArgSerIleGluValAsnTyrValProPheAspGluLeuLeuGln
TGGCTTATAGTCGCAGCCGAAGTATAGAGGTAACTATGTACCGTTTGATGAGTTGCTGC
.
4100
LysIleAlaIleSerLeuArgPheMetCysArgSerIleArgIleArgThrIleLeuSer
Lys***ArgTyrArgTyrAlaSerCysAlaAlaGlnTyrGlyTyrAlaLeuTyrTyrGln
AsnSerAspIleValThrLeuHisValProLeuAsnThrAspThrHisTyrIleIleSer
AAAATAGCGATATCGTTACGCTTCATGTGCCGCTCAATACGGATACGCACTATATTATCA
.
4200

Fig. 5 -(14/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

24/69

AlaThrAsnLysTyrArgGlu***SerLysGluHisPheLeuSerIleLeuGlyAlaVal
 ProArgThrAsnThrGluAsnGluAlaArgSerIleSerTyrGlnTyrTrpAlaArgSer
 HisGluGlnIleGlnArgMetLysGlnGlyAlaPheLeuIleAsnThrGlyArgGlyPro
 GCCACGAACAAATACAGAGAATGAAGCAAGGAGCATTTCTTATCAATACTGGGCGCGGTC

HisLeu***IleProMetSerTrpLeuLysHis***LysThrGlyAsnTrpAlaValPro
 ThrCysArgTyrLeu***ValGly***SerIleArgLysArgGluThrGlyArgCysArg
 LeuValAspThrTyrGluLeuValLysAlaLeuGluAsnGlyLysLeuGlyGlyAlaAla
 CACTTGTAGATACCTATGAGTTGGTTAAAGCATTAGAAAACGGAAACTGGGCGGTGCCG

4300

HisTrpMetTyrTrpLysGluArgLysSerPheSerThrLeuIleAlaProLysAsnGln
 IleGlyCysIleGlyArgArgGlyArgValPheLeuLeu***LeuHisProLysThrAsn
 LeuAspValLeuGluGlyGluGluGluPhePheTyrSerAspCysThrGlnLysProIle
 CATTGGATGTATTGGAAGGAGAGGAAGAGTTTTTCTACTCTGATTGCACCCAAAAACCAA

LeuIleIleAsnPheTyrLeuAsnPheLysGluCysLeuThr*****SerHisArgIle
 *****SerIlePheThr***ThrSerLysAsnAla***ArgAspAsnHisThrAlaTyr
 AspAsnGlnPheLeuLeuLysLeuGlnArgMetProAsnValIleIleThrProHisThr
 TTGATAATCAATTTTTTACTTAAACTTCAAAGAATGCCTAACGGATAATCACACCGCATA

4400

ArgProIleIleProSerLysArgCysValIleProLeuLysLysProLeuLysThrVal
 GlyLeuLeuTyrArgAlaSerValAla***TyrArg***LysAsnHis***LysLeuPhe
 AlaTyrTyrThrGluGlnAlaLeuArgAspThrValGluLysThrIleLysAsnCysLeu
 CGGCCTATTATACCGAGCAAGCGTTGCGTGATACCGTTGAAAACCATTAAAAACTGTT

4500

Fig. 5 (15/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

25/ 69

TrpIleLeuLysGlyAspArgSerMetAsnArgIleLysValAlaIleLeuPheGlyGly
GlyPhe***LysGluThrGlyAla***IleGlu***LysLeuGlnTyrCysLeuGlyVal
AspPheGluArgArgGlnGluHisGlu***AsnLysSerCysAsnThrValTrpGlyLeu
TGGATTTTGAAAGGAGACAGGAGCATGAATAGAATAAAAGTTGCAATACTGTTTGGGGGT

CysSerGluGluHisAspValSerValLysSerAlaIleGluIleAlaAlaAsnIleAsn
AlaGlnArgSerMetThrTyrArg***AsnLeuGln***Arg***ProLeuThrLeuIle
LeuArgGlyAla***ArgIleGlyLysIleCysAsnArgAspSerArg***His*****
TGCTCAGAGGAGCATGACGTATCGGTAAAATCTGCAATAGAGATAGCCGCTAACATTAAT

4600

LysGluLysTyrGluProLeuTyrIleGlyIleThrLysSerGlyValTrpLysMetCys
LysLysAsnThrSerArgTyrThrLeuGluLeuArgAsnLeuValTyrGlyLysCysAla
ArgLysIleArgAlaValIleHisTrpAsnTyrGluIleTrpCysMetGluAsnValArg
AAAGAAAATACGAGCCGTTATACATTGGAATTACGAAATCTGGTGTATGGAAAATGTGC

GluLysProCysAlaGluTrpGluAsnAspAsnCysTyrSerAlaValLeuSerProAsp
LysAsnLeuAlaArgAsnGlyLysThrThrIleAlaIleGlnLeuTyrSerArgArgIle
LysThrLeuArgGlyMetGlyLysArgGlnLeuLeuPheSerCysThrLeuAlaGly***
GAAAAACCTTGCGCGGAATGGGAAAACGACAATTGCTATTCAGCTGTACTCTCGCCGGAT

4700

LysLysMetHisGlyLeuLeuValLysLysAsnHisGluTyrGluIleAsnHisValAsp
LysLysCysThrAspTyrLeuLeuLysArgThrMetAsnMetLysSerThrMetLeuMet
LysAsnAlaArgIleThrCys***LysGluPro***Ile***AsnGlnProCys***Cys
AAAAAATGCACGGATTACTTGTTAAAAGAACCATGAATATGAAATCAACCATGTTGAT

4800

Fig. 5 (16/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

26/69

ValAlaPheSerAlaLeuHisGlyLysSerGlyGluAspGlySerIleGlnGlyLeuPhe
***HisPheGlnLeuCysMetAlaSerGlnValLysMetAspProTyrLysValCysLeu
SerIlePheSerPheAlaTrpGlnValArg***ArgTrpIleHisThrArgSerVal***
GTAGCATTTTCAGCTTTGCATGGCAAGTCAGGTGAAGATGGATCCATACAAGGTCTGTTT
GluLeuSerGlyIleProPheValGlyCysAspIleGlnSerSerAlaIleCysMetAsp
AsnCysProValSerLeuLeu***AlaAlaIlePheLysAlaGlnGlnPheValTrpThr
IleValArgTyrProPheCysArgLeuArgTyrSerLysLeuSerAsnLeuTyrGlyGln
GAATTGTCCGGTATCCCTTTTGTAGGCTGCGATATTCAAAGCTCAGCAATTTGTATGGAC
4900
LysSerLeuThrTyrIleValAlaLysAsnAlaGlyIleAlaThrProAlaPheTrpVal
AsnArg***HisThrSerLeuArgLysMetLeuGly***LeuLeuProProPheGlyLeu
IleValAspIleHisArgCysGluLysCysTrpAspSerTyrSerArgLeuLeuGlyTyr
AAATCGTTGACATACATCGTTGCGAAAAATGCTGGGATAGCTACTCCCGCCTTTTGGGTT
IleAsnLysAspAspArgProValAlaAlaThrPheThrTyrProValPheValLysPro
LeuIleLysMetIleGlyArgTrpGlnLeuArgLeuProIleLeuPheLeuLeuSerArg
*****Arg*****AlaGlyGlySerTyrValTyrLeuSerCysPheCys***AlaGly
ATTAATAAAGATGATAGGCCGGTGGCAGCTACGTTTACCTATCCTGTTTTTGTAAAGCCG
5000
AlaArgSerGlySerSerPheGlyValLysLysValAsnSerAlaAspGluLeuAspTyr
ArgValGlnAlaHisProSerVal***LysLysSerIleAlaArgThrAsnTrpThrThr
AlaPheArgLeuIleLeuArgCysGluLysSerGln***ArgGlyArgIleGlyLeuArg
GCGCGTTCAGGCTCATCCTTCGGTGTGAAAAAAGTCAATAGCGCGGACGAATTGGACTAC
5100

Fig: 5 (17/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

27/ 69

AlaIleGluSerAlaArgGlnTyrAspSerLysIleLeuIleGluGlnAlaValSerGly
GlnLeuAsnArgGlnAspAsnMetThrAlaLysSer***LeuSerArgLeuPheArgAla
Asn***IleGlyLysThrIle***GlnGlnAsnLeuAsn***AlaGlyCysPheGlyLeu
GCAATTGAATCGGCAAGACAATATGACAGCAAAATCTTAATTGAGCAGGCTGTTTCGGGC

CysGluValGlyCysAlaValLeuGlyAsnSerAlaAlaLeuValValGlyGluValAsp
ValArgSerValValArgTyrTrpGluThrValProArg***LeuLeuAlaArgTrpThr
***GlyArgLeuCysGlyIleGlyLysGlnCysArgValSerCysTrpArgGlyGlyPro
TGTGAGGTCGGTTGTGCGGTATTGGGAAACAGTGCCGCGTTAGTTGTTGGCGAGGTGGAC

5200

GlnIleArgLeuGlnTyrGlyIlePheArgIleHisGlnGluValGluProGluLysGly
LysSerGlyCysSerThrGluSerPheValPheIleArgLysSerSerArgLysLysAla
AsnGlnAlaAlaValArgAsnLeuSerTyrSerSerGlySerArgAlaGlyLysArgLeu
CAAATCAGGCTGCAGTACGGAATCTTTCGTATTCATCAGGAAGTCGAGCCGAAAAAGGC

SerGluAsnAlaValIleThrValProAlaAspLeuSerAlaGluGluArgGlyArgIle
LeuLysThrGlnLeu***ProPheProGlnThrPheGlnGlnArgSerGluAspGlyTyr
***LysArgSerTyrAsnArgSerArgArgProPheSerArgGlyAlaArgThrAspThr
TCTGAAAACGCAGTTATAACCGTTCCCGCAGACCTTTCAGCAGAGGAGCGAGGACGGATA

5300

GlnGluThrAlaLysLysIleTyrLysAlaLeuGlyCysArgGlyLeuAlaArgValAsp
ArgLysArgGlnLysLysTyrIleLysArgSerAlaValGluVal***ProValTrpIle
GlyAsnGlyLysLysAsnIle***SerAlaArgLeu***ArgSerSerProCysGlyTyr
CAGGAAACGGCAAAAAAATATATAAAGCGCTCGGCTGTAGAGGTCTAGCCCGTGTGGAT

5400

Fig. 5 (18/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

28/ 69

MetPheLeuGlnAspAsnGlyArgIl ValLeuAsnGluValAsnThrLeuProGlyPhe
CysPheTyrLysIleThrAlaAlaLeuTyr***ThrLysSerIleLeuCysProValSer
ValPheThrArg***ArgProHisCysThrGluArgSerGlnTyrSerAlaArgPheHis
ATGTTTTTACAAGATAACGGCCGCATTGTACTGAACGAAGTCAATACTCTGCCCGGTTTC

ThrSerTyrSerArgTyrProArgMetMetAlaAlaAlaGlyIleAlaLeuProGluLeu
ArgHisThrValValIleProVal***TrpProLeuGlnValLeuHisPheProAsn***
ValIleGlnSerLeuSerProTyrAspGlyArgCysArgTyrCysThrSerArgThrAsp
ACGTCATACAGTCGTTATCCCCGTATGATGGCCGCTGCAGGTATTGCACTTCCCGAAGT

5500

IleAspArgLeuIleValLeuAlaLeuLysGly*****AlaTrpLys***AspLeuLeu
LeuThrAla***SerTyr***Arg***ArgGlyAspLysHisGlyAsnArgIleTyrPhe
***ProLeuAspArgIleSerValLysGlyValIleSerMetGluIleGlyPheThrPhe
ATTGACCGCTTGATCGTATTAGCGTTAAAGGGGTGATAAGCATGGAAATAGGATTTACTT

Phe***MetLys***TyrThrValPheValGlyThrLeuAsnMetProLeuGlyIleIle
PheArg***AsnSerThrArgCysSerLeuGlyArg***IleCysHisLeuGly***Phe
LeuAspGluIleValHisGlyValArgTrpAspAlaLysTyrAlaThrTrpAspAsnPhe
TTTAGATGAAATAGTACACGGTGTTCGTTGGGACGCTAAATATGCCACTTGGGATAATT

5600

SerProGluAsnArgLeuThrValMetLys***IleAlaLeu***GlyHisThrSerTrp
HisArgLysThrGly***ArgLeu***SerLysSerHisCysArgAspIleArgValGly
ThrGlyLysProValAspGlyTyrGluValAsnArgIleValGlyThrTyrGluLeuAla
TCACCGGAAAACCGGTTGACGGTTATGAAGTAAATCGCATTGTAGGGACATACGAGTTGG

5700

Fig. 5 (19/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

29/ 69

LeuAsnArgPhe***ArgGlnLysAsnTrpLeuLeuProLysGlyThrAspCysPheTyr
***IleAlaPheGluGlyLysArgThrGlyCysTyrProArgValArgIleAlaSerMet
GluSerLeuLeuLysAlaLysGluLeuAlaAlaThrGlnGlyTyrGlyLeuLeuLeuTrp
CTGAATCGCTTTTGAAGGCAAAGAACTGGCTGCTACCCAAGGGTACGGATTGCTTCTAT

GlyThrValThrValLeuSerValLeu***ThrValLeuCysAsnGlyLeuHisSerArg
GlyArgLeuProSer***AlaCysCysLysLeuPheTyrAlaMetGlyCysThrAlaGly
AspGlyTyrArgProLysArgAlaValAsnCysPheMetGlnTrpAlaAlaGlnProGlu
GGGACGGTTACCGTCCTAAGCGTGCTGTAACTGTTTTATGCAATGGGCTGCACAGCCGG

5800

LysIleThr***GlnArgLysValIleIleProIleLeuThrGluLeuArg***PheGln
Lys***ProAspLysGlyLysLeuLeuSerGlnTyr***ProAsn***AspAspPheLys
AsnAsnLeuThrLysGluSerTyrTyrProAsnIleAspArgThrGluMetIleSerLys
AAAATAACCTGACAAAGGAAAGTTATTATCCCAATATTGACCGAACTGAGATGATTTCAA

LysAspThrTrpLeuGlnAsnGlnAlaIleAlaAlaAlaValProLeuIleLeuArgPhe
ArgIleArgGlyPheLysIleLysPro***ProArgGlnCysHis***SerTyrAlaLeu
GlyTyrValAlaSerLysSerSerHisSerArgGlySerAlaIleAspLeuThrLeuTyr
AAGGATACGTGGCTTCAAATCAAGCCATAGCCGCGGCAGTGCCATTGATCTTACGCTTT

5900

IleAsp***ThrArgValSerLeuTyrGlnTrpGlyAlaAspLeuIleLeuTrpMetAsn
SerIleArgHisGly***AlaCysThrAsnGlyGluProIle***PheTyrGly***Thr
ArgLeuAspThrGlyGluLeuValProMetGlySerArgPheAspPheMetAspGluArg
ATCGATTAGACACGGGTGAGCTTGTACCAATGGGGAGCCGATTGATTTTATGGATGAAC

6000

Fig. 5 (20/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

30/ 69

AlaLeuIleMetArgGlnMetGluTyrHisAlaMetLysArgLysIleAlaAspValCys
LeuSerSerCysGlyLysTrpAsnIleMetGln***SerAlaLysSerGlnThrPheAla
SerHisHisAlaAlaAsnGlyIleSerCysAsnGluAlaGlnAsnArgArgArgLeuArg
GCTCTCATCATGCGGCAAATGGAATATCATGCAATGAAGCGCAAATCGCAGACGTTTGC

AlaProSerTrpLysThrValGlyLeuLysHisIleAlaSerAsnGlyGlyThrMetTyr
LeuHisHisGlyLysGlnTrpVal***SerIle***ProArgMetValAlaLeuCysIle
SerIleMetGluAsnSerGlyPheGluAlaTyrSerLeuGluTrpTrpHisTyrValLeu
GCTCCATCATGGAAAACAGTGGGTTTGAAGCATATAGCCTCGAATGGTGGCACTATGTAT

6100

***GluThrAsnHisThrProIleAlaIleLeuIleSerProLeuAsnLysLeuLeuThr
LysArgArgThrIleProGln***LeuPhe***PheProArg***IleAsnPhe***Pro
ArgAspGluProTyrProAsnSerTyrPheAspPheProValLys***ThrPheAsnArg
TAAGAGACGAACCATAACCCCAATAGCTATTTTGATTTCCTTAAATAAACTTTTAACC

ValAlaArgThrAsnTyrIleSer***LeuPheArgGlnGluThrArgArgMet***Leu
LeuHisGlyGlnThrIle***AlaAsnSerPheGlyArgLysProAspValCysAsnTrp
CysThrAspLysLeuTyrLysLeuThrLeuSerAlaGlyAsnProThrTyrValThrGly
GTTGCACGGACAACTATATAAGCTAACTCTTTCGGCAGGAACCCGACGTATGTAAGT

6200

ValLeuArgGluPheIleTyrSerArg***Tyr***ArgCysLysAlaGluArgTyrCys
PheLeuGlyAsnLeuTyrIleValAspSerIleGluAspValArgGlnSerAspIleAla
Ser***GlyIleTyrIle*****IleValLeuLysMet***GlyArgAlaIleLeuArg
GTTCTTAGGGAATTTATATATAGTAGATAGTATTGAAGATGTAGGCAGAGCGATATTGC

6300

Fig. 5 (21/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

31/69

GlyHisTyrLeuArgAlaLeuArgGlnAspSerLeuIleIleArgLeuIleAla***Arg
ValIleIleCysValArgCysGlyLysIleAla*****Asp***SerHisArgGly
SerLeuSerAlaCysAlaAlaAlaArg***ProAspAsnLysThrAspArgIleGluGly
GGTCATTATCTGCGTGCGCTGCGGCAAGATAGCCTGATAATAAGACTGATCGCATAGAGG

GlyGlyIleSerHisArgProLeuSerThrGlySerSerAlaSerLeuAsnSerAlaTrp
ValValPheHisThrAlaHisCysGlnGlnAlaValGlnPrcArg***IleGlnHisGly
TrpTyrPheThrProProIleValAsnArgGlnPheSerLeuValLysPheSerMetGly
GGTGGTATTTACACCGCCCATTTGTCAACAGGCAGTTCAGCCTCGTTAAATTCAGCATGG

6400

ValSerLeuMetLysIleHisLeuHisTrp*****IleGln***GlyGluIle
TyrHisLeu***LysPheIleTyrIleGlyAspAsnSerLysSerSerArgAlaLys***
IleThrTyrGluAsnSerSerThrLeuValIleIleValAsnProValGlyArgAsnAsn
GTATCACTTATGAAAATTCATCTACATTGGTGATAATAGTAAATCCAGTAGGGCGAAATA

IleAspCysAsnLeuArgGlyLysThrAlaGlnSerGlnThrArgLeuCysArgLeuArg
LeuThrValIleTyrGlyAlaLysArgHisAsnLeuLysArgAspCysAlaVal***Gly
LeuPheThrGlyGlnAsnGlyThrIleSerAsnGluIleValProPheLysGly
ATTGACTGTAATTTACGGGGCAAAACGGCACAATCTCAAACGAGATTGTGCCGTTTAAGG

6500

GlyArgPhe***LysTyrPheIleLeuProThrIle***LeuArgArgArgLeuLysMet
GluAspSerArgAsnIleSerTyrPheGlnLeuTyrSer***GlyGlyAsp***Lys***
LysIleLeuGluIlePheHisThrSerAsnTyrIleValLysGluGluThrGluAsnGlu
GGAAGATTCTAGAAATATTTCACTTCCAACCTATATAGTTAAGGAGGAGACTGAAAATG

6600

Fig. 5 (22/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

32/ 69

LysLysLeuPhePheLeuLeuL uLeuLeuPheLeuIleTyrLeuGlyTyrAspTyrVal
ArgSerCysPhePheTyrCysTyrCysTyrSer***TyrThr***ValMetThrThrLeu
GluValValPhePheIleValIleValIleLeuAsnIleLeuArgLeu***LeuArg***
AAGAAGTTGTTTTTTTATTGTTATTGTTATTCTTAATATACTTAGGTTATGACTACGTT

AsnGluAlaLeuPheSerGlnGluLysValGluPheGlnAsnTyrAspGlnAsnProLys
MetLysHisCysPheLeuArgLysLysSerAsnPheLysIleMetIleLysIleProLys
SerThrValPheSerGlyLysSerArgIleSerLysLeuSerLysSerGlnArg
AATGAAGCACTGTTTTCTCAGGAAAAAGTCGAATTTCAAATTATGATCAAAATCCCAA

6700

GluHisLeuGluAsnSerGlyThrSerGluAsnThrGlnGluLysThrIleThrGluGlu
AsnIle***LysIleValGlyLeuLeuLysIleProLysArgLysGlnLeuGlnLysAsn
ThrPheArgLys***TrpAspPhe***LysTyrProArgGluAsnAsnTyrArgArgThr
GAACATTTAGAAAATAGTGGGACTTCTGAAAATACCCAAGAGAAAACAATTACAGAAGAA

GlnValTyrGlnGlyAsnLeuLeuLeuIleAsnSerLysTyrProValArgGlnGluVal
ArgPheIleLysGluIleCysTyr***SerIleValAsnIleLeuPheAlaLysLysCys
GlyLeuSerArgLysSerAlaIleAsnGln*****IleSerCysSerProArgSerVal
CAGGTTTATCAAGGAAATCTGCTATTAATCAATAGTAAATATCCTGTTCCCAAGAAGTG

6800

SerGlnIleSerIleTyrLeuAsnMetThrAsn*****MetAspThrGlyCys
GluValArgTyrArgGluPheIle***Thr***ArgIleAsnLysTrpIleArgValAla
LysSerAspIleValAsnLeuSerLysHisAspGluLeuIleAsnGlyTyrGlyLeuLeu
TGAAGTCAGATATCGTGAATTTATCTAAACATGACGAATTAATAAATGGATACGGGTTGC

6900

Fig. 5 (23/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

33/69

LeuIleValIlePheIleCysGlnLysLys***HisLysAsnPheGlnArgTrpSerMet
 *****TyrLeuTyrValLysArgAsnSerThrLysIlePheArgAspGlyGln***
 AspSerAsnIleTyrMetSerLysGluIleAlaGlnLysPheSerGluMetValAsnAsp
 TTGATAGTAATATTTATATGTCAAAGAAATAGCACAAAAATTTTCAGAGATGGTCAATG

 MetLeu***ArgValAlaLeuValIleLeuLeuLeuIleValAlaIleGluThrLeuMet
 CysCysLysGlyTrpArg***SerPheTyrTyr*****TrpLeuSerArgLeu*****
 AlaValLysGlyGlyValSerHisPheIleIleAsnSerGlyTyrArgAspPheAspGlu
 ATGCTGTAAAGGGTGGCGTTAGTCATTTTATTATTAATAGTGGCTATCGAGACTTTGATG
 7000
 SerLysValCysPheThrLysLysTrpGlyLeuSerMetProTyrGlnGlnValIleVal
 AlaLysCysAlaLeuProArgAsnGlyGly***ValCysLeuThrSerArgLeu*****
 GlnSerValLeuTyrGlnGluMetGlyAlaGluTyrAlaLeuProAlaGlyTyrSerGlu
 AGCAAAGTGTGCTTTACCAAGAAATGGGGGCTGAGTATGCCCTTACCAGCAGGTTATAGTG

 SerIleIleGlnValTyrHis***Met***AspGlnAla***ArgLysTrpAsnGluPro
 Ala***PheArgPheIleThrArgCysArgIleLysLeuAspGluAsnGlyThrSerPro
 HisAsnSerGlyLeuSerLeuAspValGlySerSerLeuThrLysMetGluArgAlaPro
 AGCATAATTCAGGTTTATCACTAGATGTAGGATCAAGCTTGACGAAAATGGAACGAGCCC
 7100
 LeuLysGluSerGly***LysLysMetLeuGlyAsnThrGlySerPheTyrValIleGln
 ***ArgLysValAspArgArgLysCysLeuGluIleArgValHisPheThrLeuSerArg
 GluGlyLysTrpIleGluGluAsnAlaTrpLysTyrGlyPheIleLeuArgTyrProGlu
 CTGAAGGAAAGTGGATAGAAGAAATGCTTGGAAATACGGGTTTATTTTACGTTATCCAG
 7200

Fig. 5 (24/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

34/69

ArgThrLysGlnSer***GlnGluPhe
GlyGlnAsnArgValAsnArgAsnSer
AspLysThrGluLeuThrGlyIleGln
AGGACAAAACAGAGTTAACAGGAATTC

7227

Fig. 5 (25/25)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 6 (1/2)

Ecorv

GATATCGTTACGCTTCATGTGCGCTCAATACGGATACGCACTATATTATCAGCCACGAACAAA	64
TACAGAGAATGAAGCAAGGAGCATTTCTTATCAATACTGGCGCGCTCCACTGTAGATACCTATGAGTTGGTTAAAGCATTAGAAAAACGG	155
GAACTGGCGGTCCGCATTTGGATGTAATGGAAGGAGAGAGAGTTTCTACTCTGATGCAACCCCAAAAACCAATTGATAATCAATTT	246
TTACTTAAACTTCAAAGAATGCCTAAACGTGATAATCACACCGCATACCGCCCTATTATACCGCAAGCGTTGCGTGATACCGTTGAAAAAAA	337
CCATTAAAAAAGCTGTTGGATTGTTGAAAGGAGACAGGAGC	415
<div> <div>▼ MET ASN ARG ILE LYS VAL ALA ILE LEU PHE GLY CYS</div> <div> <div>HaellI</div> <div>NlaIII</div> </div> </div>	
SER GLU GLU HIS ASP VAL SER VAL LYS SER VAL LYS SER GLY VAL TRP LYS MET CYS GLU LYS PRO CYS ALA GLU TRP	484
TCA GAG GAG AAT GAC GTA TCG GTA AAA TCT GCA ATA GAG ATA GCC GCT AAC AAT AAT AAA GAA AAA TAC	
GLU PRO LEU TYR ILE GLY ILE THR LYS SER GLY VAL TRP LYS MET CYS GLU LYS PRO CYS ALA GLU TRP	553
GAG CCG TTA TAC ATT GGA ATT ACG AAA TCT GGT GTA TGG AAA ATG TGC GAA AAA CCT TGC GCG GAA TGG	
GLU ASN ASP ASN CYS TYR SER ALA VAL LEU SER PRO ASP LYS LYS MET HIS GLY LEU LEU VAL LYS LYS	622
GAA AAC GAC AAT TGC TAT TCA GCT GTA CTC TCG CCG GAT AAA AAA ATG CAC GGA TTA CTT GTT AAA AAG	
ASN HIS GLU TYR GLU ILE ASN HIS VAL ASP VAL ALA PHE SER ALA LEU HIS GLY LYS SER GLY GLU ASP	691
AAC CAT GAA TAT GAA ATC AAC AAC CAT GTT GAT GTA GCA TTT TCA GCT TTG CAT GGC AAG TCA GGT GAA GAT	
GLY SER ILE GLN GLY LEU PHE GLU LEU SER GLY ILE PRO PHE VAL GLY CYS ASP ILE GLN SER SER ALA	760
GCA TCC ATA CAA GGT CTG TTT GAA TTG TCC GGT ATC CCT TTT GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC TCA GCA	
ILE CYS MET ASP LYS SER LEU THR TYR ILE VAL ALA LYS ASN ALA GLY ILE ALA THR PRO ALA PHE TRP	829
ATT TGT ATG GAC AAA TCG TTG ACA TAC ATC GTT GCG AAA AAT GCT GGG ATA GCT ACT CCC GCC TTT TGG	
VAL ILE ASN LYS ASP ARG PRO VAL ALA ALA THR PHE THR TYR PRO VAL PHE VAL LYS PRO ALA ARG	898
GTT ATT AAT AAA GAT GAT AGG CCG GTG GCA GCT TTT ACC TAT CCT GTT TTT AAG CCG GCG CGT	

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 6 (2/2)

SER GLY SER SER PHE GLY VAL LYS LYS VAL ASN SER ALA ASP GLU LEU ASP TYR ALA ILE GLU SER ALA 967
TCA GGC TCA TCC TTC GGT GTG AAA AAA GTC AAT AGC GCG GAC GAA TTG GAC TAC GCA ATT GAA TCG GCA
ARG GLN TYR ASP SER LYS ILE LEU ILE GLU GLN ALA VAL SER GLY CYS GLU VAL GLY CYS ALA VAL LEU 1036
AGA CAA TAT GAC AGC AAA ATC TTA ATT GAG CAG GCT GTT TCG GGC TGT GAG GTC GGT TGT GCG GTA TTG
GLY ASN SER ALA ALA LEU VAL VAL GLY GLU VAL ASP GLN ILE ARG LEU GLN TYR GLY ILE PHE ARG ILE 1105
GGA AAC AGT GCC GCG TTA GTT GGT GGC GAG GTG GAC CAA ATC AGG CTG CAG TAC GGA ATC TTT CGT ATT
HIS GLN GLU VAL GLU PRO GLU LYS GLY SER GLU ASN ALA VAL ILE THR VAL PRO ALA ASP LEU SER ALA 1174
CAT CAG GAA GTC GAG CCG GAA AAA GGC TCT GAA AAC GCA GTT ATA ACC GTT CCC GCA GAC CTT TCA GCA
GLU GLU ARG GLY ARG ILE GLN GLU THR ALA LYS LYS ILE TYR LYS ALA LEU GLY CYS ARG GLY LEU ALA 1243
GAG GAG CGA GGA CGG ATA CAG GAA ACG GCA AAA AAA ATA TAT AAA GCG CTC GGC TGT AGA GGT CTA GCC
ARG VAL ASP MET PHE LEU GLN ASP ASN GLY ARG ILE VAL LEU ASN GLU VAL ASN THR LEU PRO GLY PHE 1312
CGT GTG GAT ATG TTT TTA CAA GAT AAC GGC CGC ATT GTA CTG AAC GAA GTC AAT ACT CTG CCC GGT TTC
THR SER TYR SER ARG TYR PRO ARG MET MET ALA ALA ALA GLY ILE ALA LEU PRO GLU LEU ILE ASP ARG 1381
ACG TCA TAC AGT CGT TAT CCC CGT ATG ATG GCC GCT GCA GGT ATT GCA CTT CCC GAA CTG ATT GAC CGC
LEU ILE VAL LEU ALA LEU LYS LYS GLY *** ***
TTG ATC GTA TTA GCG TTA AAG GGG TGA TAA GCATGGAATAGGATTACTTTTITAGATGAAATAGTACACGGTTCGTT 1462
GGGACGCTAAATATGCCACTTGGGATAATTTCACCGGAAAACCGGTTACGGTTATGAAGTAAATCGCATTTAGGGACATACGAGTTGGC 1553
TGAATCGCTTTTGAAGGCAAAAGAACTGGCTGCTACCCAAAGGTTACGGATTGCTTCTATGGGACGGTTACCGTCCCTAAGCGTGTGTAAC 1644
TGTTTTATGCAATGGCTGCACAGCCGGAATAACCTGACAAAGGAAAGTTATTATCCCAATATTGCCGAACCTGAGATGATTTCAAAAG 1735
GGATACGTGGCTTCAAAATCAAGCCATAGCCGCG

SACII

IN THE DEPARTMENT

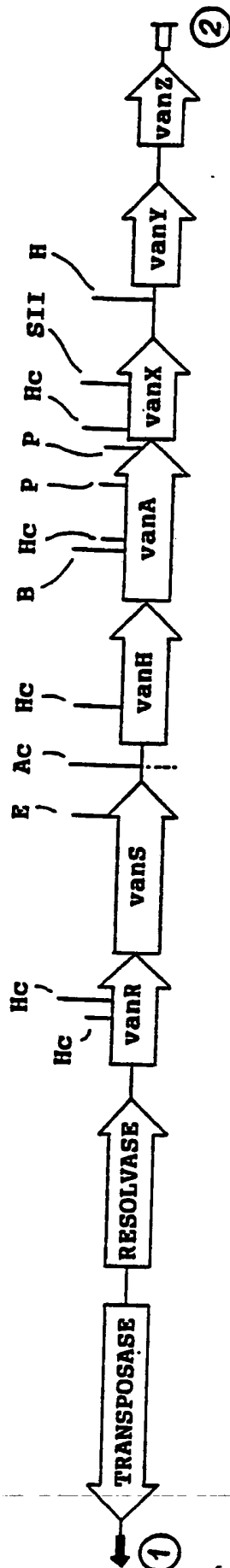
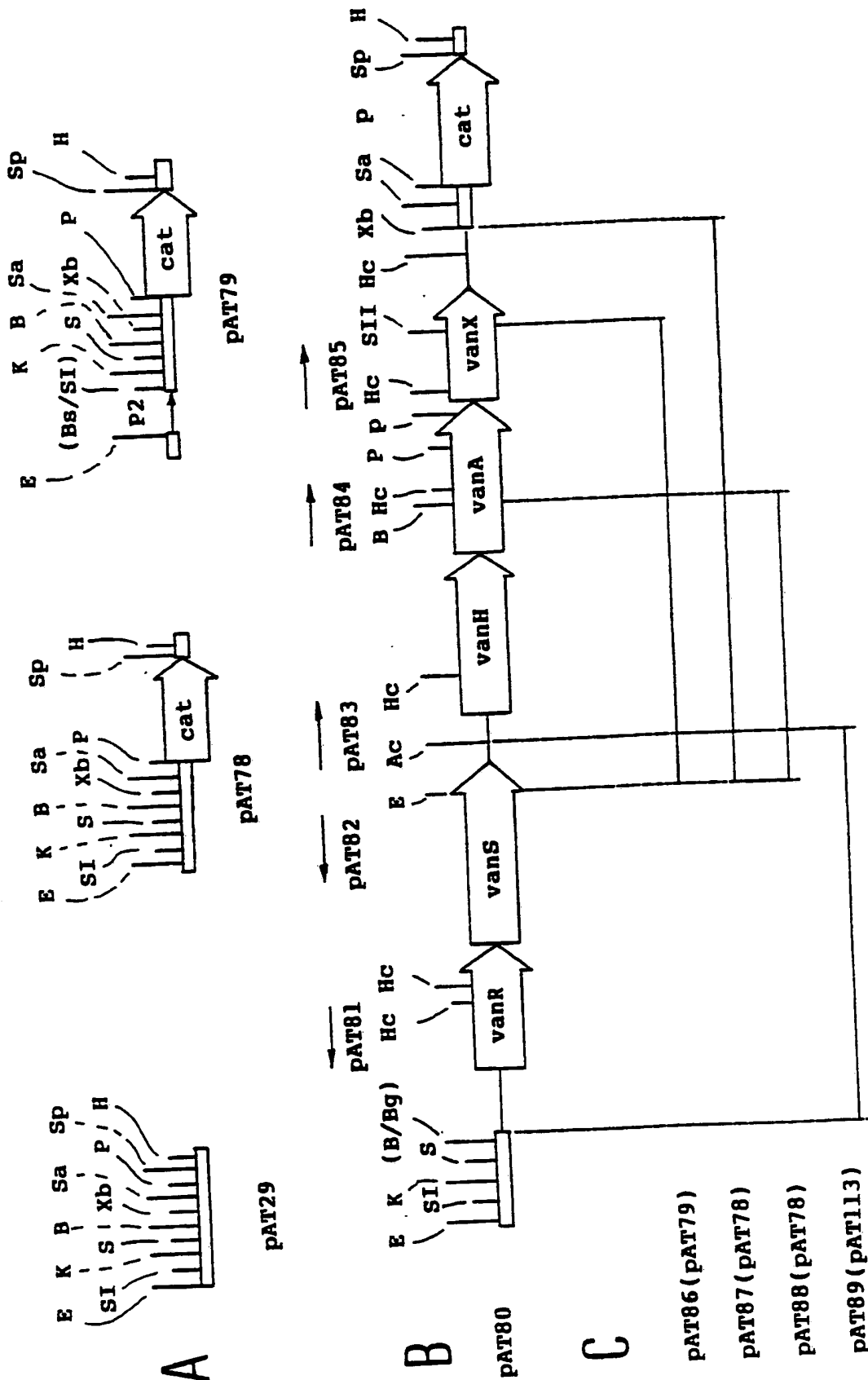


FIG. 7 a



FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (1/23)

Ia. brin "+"

1 GGG GTA GCG TCA GGA AAA TGC GGA TTT ACA ACG CTA AGC CTA TTT TCC TGA CGA ATC CCT
61 CGT TTT TAA CAA CGT TAA GAA AGT TTT AGT GGT CTT AAA GAA TTT AAT GAG ACT ACT TTC
121 TCT GAG TTA AAA TGG TAT TCT CCT AGT AAA TTA ATA TGT TCC CAA CCT AAG GGC GAC ATA
181 TGG TGT AAC AAA TCT TCA TTA AAG CTA CCT GTC CGT TTT TTA TAT TCA ACT GCT GTT GTT
241 AGG TGG AGA GTA TTC CAA ATA CTT ATA GCA TTG ATA ATT ATG TTT AAA GCA CTG GCT CTT
301 TGC AAT TGA TGC TGT ATG GTG CGT TCT CTA AGC TCA CCT TGT TTT CCG AAG AAA ATA GCT
361 CTT GCC AAT CCA TTC ATG GCT TCT CCT TTA TTC AAT CCT CTT TGT ATT TTT CTT CTT AAT
421 GAT TCA TCC GAT ATA TAA TTC AAA ATA AAG ATC GTT TTT TCT ATT CGG CCC ATC TCA CGT
481 AAG GCT GTA GCT AAG CTG TTT TGT CTT GAA TAG GAA CCT AGC TTC CCC ATA ATA AGG GAT
541 GCT GAA ACT GTT CCC TCC CTT ATA GAA TGA GCT AAT CGC AAA ACA TCC TCA TAA TTT TCT
601 TTA ATG ACC TTT GTA TTT ATT TGT CCA CGT AAA ATG GCT TCT AGT TTT GGA TAC TCA CTT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (2/23)

661 GCT TTA TCT ATC GTA AAT AAT TTT GAG TCC GAT AAA TCC CTT ATT CTT GGG GCA AAT TTA
 721 AAT CCT AAT AAA TGA GTC AGT CCG AAT ATT TGG TCA GTG TAA CCG GCA GTG TCT GTA TAA
 781 TGT TCC TCT ATG TTT AGA TCC GTC TCA TGA TGT AAC AAA CCA TCC AAA ACA TGA ATC GCA
 841 TCT CTT GAA TTA GTA TGA ATA ATC TTT GTG TAG TAA GAA GAG AAT TGA TCA CTT GTA AAT
 901 CGG TAG ATG GTG GCT CCT TTT CCA GTT CCA TAA TGT GGA TTT GCA TCT GCA TGT AGT GAT
 961 GAA ACA CCT AGC TGC ATT CTC ATA CCA TCT GAC GAA GAT GTT GTA CCG TCG CCC CAA TAG
 1021 AAA GGC AAT TGT AAT TTA TGA TGA AAG TTT ACT AAT ATG GCT TGG GCT TTA TTC ATG GCA
 1081 TCT TCA TAC ATG CGC CAT TGA GAT ACA TTG GCT AGT TGC TTA TAT GTA AGT CCG GGT GTG
 1141 GCT TCG GCC ATC TTG CTC AAG CCA ATA TTC ATT CCC ATT CCT AAA AGG GCA GCC ATG ATA
 1201 ATG ATT GTT TCT TCC TTA TCT GGT TTT CGA TTA TTG GAA GCA TGA GTG AAT TGC TCA TGA
 1261 AAT CCT GTT ATA TGG GCC ACA TCC ATG AGT AAA TCA GTT AAT TTT ATT CTT GGT AGC ATC
 1321 TGA TAA AGG CTT GCA CTA AAT TTT TTT GCT TCT TCT GGA ACA TCT TTT TCT AAG CGT GCA
 1381 AGT GAT AGC TTT CCT TTT TCA AGA GAA ACC CCA TCT AAC TTA TTG GAA TTG GCA GCT AAC
 1441 CAC TTT AAC CTT TCA TTA AAG CTG CTG GTT CTC TCC GTT ATA TAA TCT TCG AAT GAT AAA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (3/23)

1501 CTA ACT GAT AAT CTC GTA TTC CCC TTC GAT TGA TTC CAT GTA TCT TCC GAA AAC AAA TAT
 1561 TCC TCA AAA TCC CTA TAT TGT CTG CTG CCA ACA ATG GAA ACA TCT CCT GCC CGA ACA TGC
 1621 TCC CGA AGT TCT GTT AAA ACA GCC ATT TCA TAG TAA TGA CGA TTA ATT GTT GTA CCA TCA
 1681 TCC TCG TAT AAA TGT CTT TTC CAT CGT TTT GAA ATA AAA TCC ACA GGT GAG TCA TCA GGC
 1741 ACT TTT CGC TTT CCA GAT TCG TTC ATT CCT CGG ATA ATC TCA ACA GCT TGT AAA AGT GGC
 1801 TCA TTT GCC TTT GTA GAA TGA AAT TCC AAT ACT CTT AAT AGC GTT GGC GTA TAT TTT CTT
 1861 AGT GAA TAA AAC CGT TTT TGC AGT AAG TCT AAA TAA TCA TAG TCG GCA GGA CGT GCA AGT
 1921 TCC TGA GCC TCT TCT ACT GAA GAG ACA AAG GTA TTC CAT TCA ATA ACC GAT TCT AAA ACC
 1981 TTA AAA ACG TCT AAT TTT TCC TCT CTT GCT TTA ATT AAT GCT TGT CCG ATG TTC GTA AAG
 2041 TGT ATA ACT TTC TCA TTT AGC TTT TTA CCG TTT TGT TTC TGG ATT TCC TCT TGA GCC TTA
 2101 CGA CCT TTT GAT AAC AAA CTA AGT ATT TGC CTA TCA TGA ATT TCA AAC GCT TTA TCC GTT
 2161 AGC TCC TGA GTA AGT TGT AAT AAA TAG ATG GTT AAT ATC GAA TAA CGT TTA TTT TCT TGA
 2221 AAG TCA CGG AAT GCA TAC GGC TCG TAT CTT GAG CCT AAG CGA GAC AGC TGC AAC AGG CGG
 2281 TTA CGG TGC AAA TGA CTA ATT TGC ACT GTT TCT AAA TCC ATT CCT CGT ATG TAT TCG AGT
 2341

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (4/23)

CGT TCT ATT ATT TTT AGA AAA GTT TCG GGT GAA GGA TGA CCC GGT GGC TCT TTT AAC CAA
 2401
 CCC AAT ATC GTT TTA TTG GAT TCG GAT GGA TGC TGC GAG GTA ATA ATC CCT TCA AGC TTT
 2461
 TCT TTT TGC TCA TTT GTT AGA GAT TTA CTA ACC GTA TTA AAT AGC TTC TTT TCA GCC ATT
 2521
 GCC CTT GCT TCC CAC ACC ATT CTT TCA AGT GTA GTG ATA GCA GGC AGT ATA ATT TTG TTT
 2581
 TTT CTT AGA AAA TCT ATG CAT TCA TGC AGT AGA TGA ATG GCA TCA CCA TTT TCC AAA GCT
 2641
 AAT TGA TGA AGG TAC TTA AAT GTC ATT CGA TAT TCA CTC AGG GTA AAA GTT ACA AAG TCG
 2701
 TAT TCA CTT CGA ATT TCT TTC AAA TGA TCC CAA AGT GTA TTT TCC CTT TGA GGA TAA TGA
 2761
 TCA AGC GAG GAT GGA CTA ACA CCA ATC TGT TTC GAT ATA TAT TGT ATG ACC GAA TCT GGG
 2821
 ATG CTT TTG ATA TGA GTG TAT GGC CAA CCG GGA TAC CGA AGA ACA GCT AAT TGA ACA GCA
 2881
 AAT CCT AAA CGG TTT TCT TCC CTC CTT CGC TTA TTA ACT ATT TCT AAA TCC CGT TTG GAA
 2941
 AAA GTG AAG TAG GTC CCC AGT ATC CAT TCA TCT TCA GGG ATT TGC ATA AAA GCC TGT CTC
 3001
 TGT TCC GGT GTA AGC AAT TCT CTA CCT CTC GCA ATT TTC ATT CAG TAT CAT TCC ATT TCT
 3061
 GTA TTT TCA ATT TAT TAG TTC AAT TAT ATA TCA ATA GAG TGT ACT CTA TTG ATA CAA ATG
 3121
 TAG TAG ACT GAT AAA ATC ATA GTT AAG AGC GTC TCA TAA GAC TTG TCT CAA AAA TGA GGT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (5/23)

3181 **résolvase**
 LEU ARG LYS ILE GLY TYR ILE ARG VAL SER SER THR ASN GLN ASN PRO SER ARG
 GAT ATT TTG CCG AAA ATC GGT TAT ATT CGT GTC AGT TCG ACT AAC CAG AAT CCT TCA AGA
 3241
 GLN PHE GLN GLN LEU ASN GLU ILE GLY MET ASP ILE ILE TYR GLU GLU LYS VAL SER GLY
 CAA TTT CAG CAG TTG AAC GAG ATC GGA ATG GAT ATT ATA TAT GAA GAG AAA GTT TCA GGA
 3301
 ALA THR LYS ASP ARG GLU GLN LEU GLN LYS VAL LEU ASP ASP LEU GLN GLU ASP ASP ILE
 GCA ACA AAG GAT CGC GAG CAA CTT CAA AAA GTG TTA GAC GAT TTA CAG GAA GAT GAC ATC
 3361
 ILE TYR VAL THR ASP LEU THR ARG ILE THR ARG SER THR GLN ASP LEU PHE GLU LEU ILE
 ATT TAT GTT ACA GAC TTA ACT CGA ATC ATC ACT CGT AGT ACA CAA GAT CTA TTT GAA TTA ATC
 3421
 ASP ASN ILE ARG ASP LYS LYS ALA SER LEU LYS SER LEU LYS ASP THR TRP LEU ASP LEU
 GAT AAC ATA CGA GAT AAA AAG GCA AGT TTA AAA TCA CTA AAA GAT ACA TGG CTT GAT TTA
 3481
 SER GLU ASP ASN PRO TYR SER GLN PHE LEU ILE THR VAL MET ALA GLY VAL ASN GLN LEU
 TCA GAA GAT AAT CCA TAC AGC CAA TTC TTA ATT ACT GTA ATG GCT GGT GGT AAC CAA TTA
 3541
 GLU ARG ASP LEU ILE ARG MET ARG GLN ARG GLU GLY ILE GLU LEU ALA LYS LYS GLU GLY
 GAG CGA GAT CTT ATT CGG ATG AGA CAA CGT GAA GGG ATT GAA TTG GCT AAG AAA GAA GGA
 3601
 LYS PHE LYS GLY ARG LEU LYS LYS TYR HIS LYS ASN HIS ALA GLY MET ASN TYR ALA VAL
 AAG TTT AAA GGT CGA TTA AAG AAG TAT CAT AAA AAT CAC GCA GGA ATG AAT TAT GCG GTA
 3661
 LYS LEU TYR LYS GLU GLY ASN MET THR VAL ASN GLN ILE CYS GLU ILE THR ASN VAL SER
 AAG CTA TAT AAA GAA GGA AAT ATG ACT ACT GTA AAT CAA ATT TGT GAA ATT ACT AAT GTA TCT
 3721
 ARG ALA SER LEU TYR ARG LYS LEU SER GLU VAL ASN ASN
 AGG GCT TCA TTA TAC AGG AAA TTA TCA GAA GTG AAT AAT TAG CCA TTC TGT ATT CCG CTA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (6/23)

3781 ATG GGC AAT ATT TTT AAA GAA AAG GAA ACT ATA AAA TAT TAA CAG CCT CCT AGC GAT
 3841 GCC GAA AAG CCC TTT GAT AAA AAA AGA ATC ATC TTA AGA AAT TCT TAG TCA TTT ATT
 3901 ATG TAA ATG CTT ATA AAT TCG GCC CTA TAA TCT GAT AAA TTA TTA AGG GCA AAC TTA TGT
 3961 VanR MET SER ASP LYS ILE LEU ILE VAL ASP ASP GLU HIS GLU ILE ALA
 GAA AGG GTG ATA ACT ATG AGC GAT AAA ATA CTT ATT GTG GAT GAT GAA CAT GAA ATT GCC
 4021 ASP LEU VAL GLU LEU TYR LEU LYS ASN GLU ASN TYR THR VAL PHE LYS TYR TYR THR ALA
 GAT TTG GTT GAA TTA TAC TTA AAA AAC GAG AAT TAT ACG GTT TTC AAA TAC TAT ACC GCC
 4081 LYS GLU ALA LEU GLU CYS ILE ASP LYS SER GLU ILE ASP LEU ALA ILE LEU ASP ILE MET
 AAA GAA GCA TTG GAA TGT ATA GAC AAG TCT GAG ATT GAC CTT GCC ATA TTG GAC ATC ATG
 4141 LEU PRO GLY THR SER GLY LEU THR ILE CYS GLN LYS ILE ARG ASP LYS HIS THR TYR PRO
 CTT CCC GGC ACA AGC GGC CTT ACT ATC TGT CAA AAA ATA AGG GAC AAG CAC ACC TAT CCG
 4201 ILE ILE MET LEU THR GLY LYS ASP THR GLU VAL ASP LYS ILE THR GLY LEU THR ILE GLY
 ATT ATC ATG CTG ACC GGG AAA GAT ACA GAG GTA GAT AAA ATT ACA GGG TTA ACA ATC GGC
 4261 ALA ASP ASP TYR ILE THR LYS PRO PHE ARG PRO LEU GLU LEU ILE ALA ARG VAL LYS ALA
 GCG GAT GAT TAT ATA ACG AAG CCC TTT CGC CCA CTG GAG TTA ATT GCT CGG GTA AAG GCC
 4321 GLN LEU ARG ARG TYR LYS LYS PHE SER GLY VAL LYS GLU GLN ASN GLU ASN VAL ILE VAL
 CAG TTG CGC CGA TAC AAA AAA TTC AGT GGA GTA AAG GAG CAG AAC GAA AAT GTT ATC GTC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (7/23)

4381 HIS SER GLY LEU VAL ILE ASN VAL ASN THR HIS GLU CYS TYR LEU ASN GLU LYS GLN LEU
 CAC TCC GGC CTT GTC ATT AAT GTT AAC ACC CAT GAG TGT TAT CTG AAC GAG AAG CAG TTA
 4441 SER LEU THR PRO THR GLU PHE SER ILE LEU ARG ILE LEU CYS GLU ASN LYS GLY ASN VAL
 TCC CTT ACT CCC ACC GAG TTT TCA ATA CTG CGA ATC CTC TGT GAA AAC AAG GGG AAT GTG
 4501 VAL SER SER GLU LEU LEU PHE HIS GLU ILE TRP GLY ASP GLU TYR PHE SER LYS SER ASN
 GTT AGC TCC GAG CTG CTA TTT CAT GAG ATA TGG GGC GAC GAA TAT TTC AGC AAG AGC AAC
 4561 ASN THR ILE THR VAL HIS ILE ARG HIS LEU ARG GLU LYS MET ASN ASP THR ILE ASP ASN
 AAC ACC ATC ACC GTG CAT ATC CGG CAT TTG CGC GAA AAA ATG AAC GAC ACC ATT GAT AAT
 4621 PRO LYS TYR ILE LYS THR VAL TRP GLY VALGLYTYRILYSILEGLULYS
 CCG AAA TAT ATA AAA ACG GTA TGG GGG GTTGGTTATAAAATTGAAAAAT AAA AAA AAC GAC
 4682 Vans LEUVALILELYSLEULYSASN LYS LYS ASN ASP
 TYR SER LYS LEU GLU ARG LYS LEU TYR MET TYR ILE VAL ALA ILE VAL VAL VAL ALA ILE
 TAT TCC AAA CTA GAA CGA AAA CTT TAC ATG TAT ATC GTT GCA ATT GTT GTG GTA GCA ATT
 4742 VAL PHE VAL LEU TYR ILE ARG SER MET ILE ARG GLY LYS LEU GLY ASP TRP ILE LEU SER
 GTA TTC GTG TTG TAT ATT CGT TCA ATG ATC CGA GGG AAA CTT GGG GAT TGG ATC TTA AGT
 4802 ILE LEU GLU ASN LYS TYR ASP LEU ASN HIS LEU ASP ALA MET LYS LEU TYR GLN TYR SER
 ATT TTG GAA AAC AAA TAT GAC TTA AAT CAC CTG GAC GCG ATG AAA TTA TAT CAA TAT TCC
 4862 ILE ARG ASN ASN ILE ASP ILE PHE ILE TYR VAL ALA ILE VAL ILE SER ILE LEU ILE LEU
 ATA CGG AAC AAT ATA GAT ATC TTT ATT TAT GTG GCG ATT GTC ATT AGT ATT CTT ATT CTA
 4922 CYS ARG VAL MET LEU SER LYS PHE ALA LYS TYR PHE ASP GLU ILE ASN THR GLY ILE ASP
 TGT CGC GTC ATG CTT TCA AAA TTC GCA AAA TAC TTT GAC GAG ATA AAT ACC GGC ATT GAT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (8/23)

4982 VAL LEU ILE GLN ASN GLU ASP LYS GLN ILE GLU LEU SER ALA GLU MET ASP VAL MET GLU
 GTA CTT ATT CAG AAC GAA GAT AAA CAA ATT GAG CTT TCT GCG GAA ATG GAT GTT ATG GAA
 5042 GLN LYS LEU ASN THR LEU LYS ARG THR LEU GLU LYS ARG GLU GLN ASP ALA LYS LEU ALA
 CAA AAG CTC AAC ACA TTA AAA CGG ACT CTG GAA AAG CGA GAG CAG GAT GCA AAG CTG GCC
 5102 GLU GLN ARG LYS ASN ASP VAL VAL MET TYR LEU ALA HIS ASP ILE LYS THR PRO LEU THR
 GAA CAA AGA AAA AAT GAC GTT GTT ATG TAC TTG GCG CAC GAT ATT AAA ACG CCC CTT ACA
 5162 SER ILE ILE GLY TYR LEU SER LEU LEU ASP GLU ALA PRO ASP MET PRO VAL ASP GLN LYS
 TCC ATT ATC GGT TAT TTG AGC CTG CTT GAC GAG GCT CCA GAC ATG CCG GTA GAT CAA AAG
 5222 ALA LYS TYR VAL HIS ILE THR LEU ASP LYS ALA TYR ARG LEU GLU GLN LEU ILE ASP GLU
 GCA AAG TAT GTG CAT ATC ACG TTG GAC AAA GCG TAT CGA CTC GAA CAG CTA ATC GAC GAG
 5282 PHE PHE GLU ILE THR ARG TYR ASN LEU GLN THR ILE THR LEU THR LYS THR HIS ILE ASP
 TTT TTT GAG ATT ACA CGG TAT AAC CTA CAA ACG ATA ACG CTA ACA AAA ACG CAC ATA GAC
 5342 LEU TYR TYR MET LEU VAL GLN MET THR ASP GLU PHE TYR PRO GLN LEU SER ALA HIS GLY
 CTA TAC TAT ATG CTG GTG CAG ATG ACC GAT GAA TTT TAT CCT CAG CTT TCC GCA CAT GGA
 5402 LYS GLN ALA VAL ILE HIS ALA PRO GLU ASP LEU THR VAL SER GLY ASP PRO ASP LYS LEU
 AAA CAG GCG GTT ATT CAC GCC CCG GAG GAT CTG ACC GTG TCC GCG GAC CCT GAT AAA CTC
 5462 ALA ARG VAL PHE ASN ASN ILE LEU LYS ASN ALA ALA TYR SER GLU ASP ASN SER ILE
 GCG AGA GTC TTT AAC AAC AAC ATT TTG AAA AAC GCC GCT GCA TAC AGT GAG GAT AAC AGC ATC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (9/23)

5522 ILE ASP ILE THR ALA GLY LEU SER GLY ASP VAL VAL SER ILE GLU PHE LYS ASN THR GLY
 ATT GAC ATT ACC GCG GGC CTC TCC GGG GAT GTG GTG TCA ATC GAA TTC AAG AAC ACT GGA
 5582 SER ILE PRO LYS ASP LYS LEU ALA ILE PHE GLU LYS PHE TYR ARG LEU ASP ASN ALA
 AGC ATC CCA AAA GAT AAG CTA GCT GCC ATA TTT GAA AAG TTC TAT AGG CTG GAC AAT GCT
 5642 ARG SER SER ASP THR GLY GLY ALA GLY LEU GLY LEU ALA ILE ALA LYS GLU ILE ILE VAL
 CGT TCT TCC GAT ACG GGT GGC GCG GGA CTT GGA TTG GCG ATT GCA AAA GAA ATT ATT GTT
 5702 GLN HIS GLY GLY GLN ILE TYR ALA GLU SER ASN ASP ASN TYR THR THR PHE ARG VAL GLU
 CAG CAT GGA GGG CAG ATT TAC GCG GAA AGC AAT GAT AAC TAT ACG ACG TTT AGG GTA GAG
 5762 LEU PRO ALA MET PRO ASP LEU VAL ASP LYS ARG ARG SER
 CTT CCA GCG ATG CCA GAC TTG GTT GAT AAA AGG AGG TCC TAA GA GAT GTA TAT AAT TTT
 5821 TTA GGA AAA TCT CAA GGT TAT CTT TAC TTT TTC TTA GGA AAT TAA CAA TTT AAT ATT AAG
 5881 AAA CGG CTC GTT CTT ACA CGG TAG ACT TAA TAC CGT AAG AAC GAG CCG TTT TCG TTC TTC
 5941 AGA GAA AGA TTT GAC AAG ATT ACC ATT GGC ATC CCC GTT TTA TTT GGT GCC TTT CAC AGA
 6001
 VanH MET ASN ASN ILE GLY ILE THR VAL TYR GLY CYS GLU GLN ASP GLU
 AAGGTTGG TCT TAA TT ATG AAT AAC ATC GGC ATT ACT GTT TAT GGA TGT GAG CAG GAT GAG
 6063
 ALA ASP ALA PHE HIS ALA LEU SER PRO ARG PHE GLY VAL MET ALA THR ILE ILE ASN ALA
 GCA GAT GCA TTC CAT GCT CTT TCG CCT CGC TTT GGC GTT ATG GCA ACG ATA ATT AAC GCC
 6123

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (10/23)

ASN VAL SER GLU SER ASN ALA LYS SER ALA PRO PHE ASN GLN CYS ILE SER VAL GLY HIS
 AAC GTG TCG GAA TCC AAC GCC AAA TCC GCG CCT TTC AAT CAA TGT ATC AGT GTG GGA CAT
 6183
 LYS SER GLU ILE SER ALA SER ILE LEU LEU ALA LEU LYS ARG ALA GLY VAL LYS TYR ILE
 AAA TCA GAG ATT TCC GCC TCT ATT CTT CTT GCG CTG AAG AGA GCC GGT GTG AAA TAT ATT
 6243
 SER THR ARG SER ILE GLY CYS ASN HIS ILE ASP THR THR ALA ALA LYS ARG MET GLY ILE
 TCT ACC CGA AGC ATC GGC TGC AAT CAT ATA GAT ACA ACT GCT AAG AGA ATG GGC ATC
 6303
 THR VAL ASP ASN VAL ALA TYR SER PRO ASP SER VAL ALA ASP TYR THR MET MET LEU ILE
 ACT GTC GAC AAT GTG GCG TAC TCG CCG GAT AGC GTT GCC GAT TAT ACT ATG ATG CTA ATT
 6363
 LEU MET ALA VAL ARG ASN VAL LYS SER ILE VAL ARG SER VAL GLU LYS HIS ASP PHE ARG
 CTT ATG GCA GTA CGC AAC GTA AAA TCG ATT GTG CGC TCT GTG GAA AAA CAT GAT TTC AGG
 6423
 LEU ASP SER ASP ARG GLY LYS VAL LEU SER ASP MET THR VAL GLY VAL GLY THR GLY
 TTG GAC AGC GAC CGT GGC AAG GTA CTC AGC GAC ATG ACA GTT GGT GTG GTG GGA ACG GGC
 6483
 GLN ILE GLY LYS ALA VAL ILE GLU ARG LEU ARG GLY PHE GLY CYS LYS VAL LEU ALA TYR
 CAG ATA GGC AAA GCG GTT ATT GAG CGG CGG CTG CGA GGA TTT GGA TGT AAA GTG TTG GCT TAT
 6543
 SER ARG SER ARG SER ILE GLU VAL ASN TYR VAL PRO PHE ASP GLU LEU LEU GLN ASN SER
 AGT CGC AGC CGA AGT ATA GAG GTA AAC TAT GTA CCG TTT GAT GAG TTG CTG CAA AAT AGC
 6603
 ASP ILE VAL THR LEU HIS VAL PRO LEU ASN THR ASP THR HIS TYR ILE ILE SER HIS GLU
 GAT ATC GTT ACG CTT CAT GTG CCG CTC AAT ACG GAT ACG CAC TAT ATT ATC AGC CAC GAA
 6663
 GLN ILE GLN ARG MET LYS GLN GLY ALA PHE LEU ILE ASN THR GLY ARG GLY PRO LEU VAL
 CAA ATA CAG AGA ATG AAG CAA GGA GCA TTT CTT ATC AAT ACT GGG CGC GGT CCA CTT GTA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (11/23)

6723 ASP THR TYR GLU LEU VAL LYS ALA LEU GLY ASN GLY LYS LEU GLY GLY ALA ALA LEU ASP
 GAT ACC TAT GAG TTT GAA GCA TTA GAA AAC GGG AAA CTG GGC GGT GCC GCA TTG GAT
 6783 VAL LEU GLU GLY GLU GLU PHE PHE TYR SER ASP CYS THR GLN LYS PRO ILE ASP ASN
 GTA TTG GAA GGA GAG GAA GAG TTT TTC TAC TCT GAT TGC ACC CAA AAA CCA ATT GAT AAT
 6843 GLN PHE LEU LEU LYS LEU GLN ARG MET PRO ASN VAL ILE ILE THR PRO HIS THR ALA TYR
 CAA TTT TTA CTT AAA CTT CAA AGA ATG CCT AAC GTG ATA ATC ACA CCG CAT ACG GCC TAT
 6903 TYR THR GLU GLN ALA LEU ARG ASP THR VAL GLU LYS THR ILE LYS ASN CYS LEU ASP PHE
 TAT ACC GAG CAA GCG TTG CGT GAT ACC GTT GAA AAA ACC ATT AAA AAC TGT TTG GAT TTT
 6963 VANA METASN ARG ILE LYS VAL ALA ILE LEU PHE GLY GLY CYS SER
 GAA AGG AGA CAG GAG CATGAAT AGA ATA AAA GTT GCA ATA CTG TTT GGG GGT TGC TCA
 7021 GLU ARG ARG GLN GLU HISGLU
 GLU GLU HIS ASP VAL SER VAL LYS SER ALA ILE GLU ILE ALA ALA ASN ILE ASN LYS GLU
 GAG GAG CAT GAC GTA TCG GTA AAA TCT GCA ATA GAG ATA GCC GCT AAC ATT AAT AAA GAA
 7081 LYS TYR GLU PRO LEU TYR ILE GLY ILE THR LYS SER GLY VAL TRP LYS MET CYS GLU LYS
 AAA TAC GAG CCG TTA TAC ATT GGA ATT ACG AAA TCT GGT GTA TGG AAA ATG TGC GAA AAA
 7141 PRO CYS ALA GLU TRP GLU ASN ASP ASN CYS TYR SER ALA VAL LEU SER PRO ASP LYS LYS
 CCT TGC GCG GAA TGG GAA AAC GAC AAT TGC TAT TCA GCT GTA CTC TCG CCG GAT AAA AAA
 7201 MET HIS GLY LEU LEU VAL LYS LYS ASN HIS GLU TYR GLU ILE ASN HIS VAL ASP VAL ALA
 ATG CAC GGA TTA CTT GTT GAA AGA AAC CAT GAA TAT GAA ATC AAC CAT GTT GAT GTA GCA
 7261

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (12/23)

PHE SER ALA LEU HIS GLY LYS SER GLY GLU ASP GLY SER ILE GLN GLY LEU PHE GLU LEU
 TTT TCA GCT TTG CAT GGC AAG TCA GGT GAA GAT GGA TCC ATA CAA GGT CTG TTT GAA TTG
 7321
 SER GLY ILE PRO PHE VAL GLY CYS ASP ILE GLN SER SER ALA ILE CYS MET ASP LYS SER
 TCC GGT ATC CCT TTT GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC TCA GCA ATT TGT ATG GAC AAA TCG
 7381
 LEU THR TYR ILE VAL ALA LYS ASN ALA GLY ILE ALA THR PRO ALA PHE TRP VAL ILE ASN
 TTG ACA TAC ATC GTT GCG AAA AAT GCT GGG ATA GCT ACT CCC GCC TTT TGG GTT ATT AAT
 7441
 LYS ASP ASP ARG PRO VAL ALA ALA THR PHE THR TYR PRO VAL PHE VAL LYS PRO ALA ARG
 AAA GAT GAT AGG CCG GTG GCA GCT ACG TTT ACC TAT CCT GTT TTT GTT AAG CCG GCG CGT
 7501
 SER GLY SER SER PHE GLY VAL LYS LYS VAL ASN SER ALA ASP GLU LEU ASP TYR ALA ILE
 TCA GGC TCA TCC TTC GGT GTG AAA AAA GTC AAT AGC GCG GAC GAA TTG GAC TAC GCA ATT
 7561
 GLU SER ALA ARG GLN TYR ASP SER LYS ILE LEU ILE GLU GLN ALA VAL SER GLY CYS GLU
 GAA TCG GCA AGA CAA TAT GAC AGC AAA ATC TTA ATT GAG CAG GCT GTT TCG GGC TGT GAG
 7621
 VAL GLY CYS ALA VAL LEU GLY ASN SER ALA ALA LEU VAL VAL GLY GLU VAL ASP GLN ILE
 GTC GGT TGT GCG GTA TTG GGA AAC AGT GCC GCG TTA GTT GGT GGC GAG GTG GAC CAA ATC
 7681
 ARG LEU GLN TYR GLY ILE PHE ARG ILE HIS GLN GLU VAL GLU PRO GLU LYS GLY SER GLU
 AGG CTG CAG TAC GGA ATC TTT CGT ATT CAT CAG GAA GTC GAG CCG GAA AAA GGC TCT GAA
 7741
 ASN ALA VAL ILE THR VAL PRO ALA ASP LEU SER ALA GLU GLU ARG GLY ARG ILE GLN GLU
 AAC GCA GTT ATA ACC GTT CCC GCA GAC CTT TCA GCA GAG GAG CGA GGA CGG ATA CAG GAA
 7801
 THR ALA LYS LYS ILE TYR LYS ALA LEU GLY CYS ARG GLY LEU ALA ARG VAL ASP MET PHE
 ACG GCA AAA AAA ATA TAT AAA GCG CTC GGC TGT AGA GGT CTA GCC CGT GTG GAT ATG TTT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

51/69

FIGURE 8 (13/23)

7861 LEU GLN ASP ASN GLY ARG ILE VAL LEU ASN GLU VAL ASN THR LEU PRO GLY PHE THR SER
 TTA CAA GAT AAC GGC CGC ATT GTA CTG AAC GAA GTC AAT ACT CTG CCC GGT TTC ACG TCA
 7921 TYR SER ARG TYR PRO ARG MET MET ALA ALA GLY ILE ALA LEU PRO GLU LEU ILE ASP
 TAC AGT CGT TAT CCC CGT ATG ATG GCC GCT GCA GGT ATT GCA CTT CCC GAA CTG ATT GAC
 7981 ARG LEU ILE VAL LEU ALA LEU LYS GLY
 CGC TTG ATC GTA TTA GCG TTA ARG GGG TGATAAGC ATG GAA ATA GGA TTT ACT TTT TTA GAT
 8043 Vax MET GLU ILE GLY PHE THR PHE LEU ASP
 GLU ILE VAL HIS GLY VAL ARG TRP ASP ALA LYS TYR ALA THR TRP ASP ASN PHE THR GLY
 GAA ATA GTA CAC GGT GGT GGT TGG GAC GCT AAA TAT GCC ACT TGG GAT AAT TTC ACC GGA
 8103 LYS PRO VAL ASP GLY TYR GLU VAL ASN ARG ILE VAL GLY THR TYR GLU LEU ALA GLU SER
 AAA CCG GTT GAC GGT TAT GAA GTA AAT CGC ATT GTA GGG ACA TAC GAG TTG GCT GAA TCG
 8163 LEU LEU LYS ALA LYS GLU LEU ALA ALA THR GLN GLY TYR GLY LEU LEU TRP ASP GLY
 CTT TTG AAG GCA AAA GAA GAA CTG GCT GCT ACC CAA GGG TAC GGA TTG CTT CTA TGG GAC GGT
 8223 TYR ARG PRO LYS ARG ALA VAL ASN CYS PHE MET GLN TRP ALA ALA GLN PRO GLU ASN ASN
 TAC CGT CCT AAG CGT GCT GTA AAC TGT TTT ATG CAA TGG GCT GCA CAG CCG GAA AAT AAC
 8283 LEU THR LYS GLU SER TYR TYR TYR PRO ASN ILE ASP ARG THR GLU MET ILE SER LYS GLY TYR
 CTG ACA AAG GAA AGT TAT TAT TAT CCC AAT ATT GAC CGA ACT GAG ATG ATT TCA AAA GGA TAC
 8343 VAL ALA SER LYS SER SER HIS SER ARG GLY SER ALA ILE ASP LEU THR LEU TYR ARG LEU
 GTG GCT TCA AAA TCA AGC CAT AGC CGC GGC AGT GCC ATT GAT CTT ACG CTT TAT CGA TTA
 8403 ASP THR GLY GLU LEU VAL PRO MET GLY SER ARG PHE ASP PHE MET ASP GLU ARG SER HIS
 GAC ACG GGT GAG CTT GTA CCA ATG GGG AGC CGA TTT GAT TTT ATG GAT GAA CGC TCT CAT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (14/23)

8463 HIS ALA ALA ASN GLY ILE SER CYS ASN GLU ALA GLN ASN ARG ARG ARG ARG LEU ARG SER ILE
 CAT GCG GCA AAT GGA ATA TCA TGC AAT GAA GCG CAA AAT CGC AGA CGT TTG CGC TCC ATC
 8523 MET GLU ASN SER GLY PHE GLU ALA TYR SER LEU GLU TRP TRP HIS TYR VAL LEU ARG ASP
 ATG GAA AAC AGT GGG TTT GAA GCA TAT AGC CTC GAA TGG TGG CAC TAT GTA TTA AGA GAC
 8583 GLU PRO TYR PRO ASN SER TYR PHE ASP PHE PRO VAL LYS
 GAA CCA TAC CCC AAT AGC TAT TTT GAT TTC CCC GTT AAA TAAA CTT TTA ACC GTT GCA
 8641 CGG ACA AAC TAT ATA AGC TAA CTC TTT CGG CAG GAA ACC CGA CGT ATG TAA CTG GTT CTT
 8701 AGG GAA TTT ATA TAT AGT AGA TAG TAT TGA AGA TGT AAG GCA GAG CGA TAT TGC GGT CAT
 8761 TAT CTG CGT GCG CTG CCG CAA GAT AGC CTG ATA ATA AGA CTG ATC GCA TAG AGG GGT GGT
 8821 ATT TCA CAC CGC CCA TTG TCA ACA GGC AGT TCA GCC TCG TTA AAT TCA GCA TGG GTA TCA
 8881 CTT ATG AAA ATT CAT CTA CAT TGG TGA TAA TAG TAA ATC CAG TAG GGC GAA ATA ATT GAC
 8941 TGT AAT TTA CGG GGC AAA ACG GCA CAA TCT CAA ACG AGA TTG TGC CGT TTA AGG GGA AGA
 9001 **VanY** MET LYS LYS
 TTC TAG AAA TAT TTC ATA CTT CCA ACT ATA TAG TTA AGG AGG AGA CTG AAA ATG AAG AAG
 9061 LEU PHE PHE LEU LEU LEU LEU PHE LEU ILE TYR LEU GLY TYR ASP TYR VAL ASN GLU
 TTG TTT TTT TTA TTG TTA TTG TTA TTC TTA ATA TAC TTA GGT TAT GAC TAC GTT AAT GAA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (15/23)

9121 ALA LEU PHE SER GLN GLU VAL GLU PHE GLN ASN TYR ASP GLN ASN PRO LYS GLU HIS
 GCA CTG TTT TCT CAG GAA AAA GTC GAA TTT CAA AAT TAT GAT CAA AAT CCC AAA GAA CAT
 9181 LEU GLU ASN SER GLY THR SER GLU ASN THR GLN GLU LYS THR ILE THR GLU GLU GLN VAL
 TTA GAA AAT AGT GGG ACT TCT GAA AAT ACC CAA GAG AAA ACA ATT ACA GAA GAA CAG GTT
 9241 TYR GLN GLY ASN LEU LEU ILE ASN SER LYS TYR PRO VAL ARG GLN GLU SER VAL LYS
 TAT CAA GGA AAT CTG CTA TTA ATC AAT AGT AAA TAT CCT GTT CGC CAA GAA AGT GTG AAG
 9301 SER ASP ILE VAL ASN LEU SER LYS HIS ASP GLU LEU ILE ASN GLY TYR GLY LEU LEU ASP
 TCA GAT ATC GTG AAT TTA TCT AAA CAT GAC GAA TTA ATA AAT GGA TAC GGG TTG CTT GAT
 9361 SER ASN ILE TYR MET SER LYS GLU ILE ALA GLN LYS PHE SER GLU MET VAL ASN ASP ALA
 AGT AAT ATT TAT ATG TCA AAA GAA ATA GCA CAA AAA TTT TCA GAG ATG GTC AAT GAT GCT
 9421 VAL LYS GLY GLY VAL SER HIS PHE ILE ILE ASN SER GLY TYR ARG ASP PHE ASP GLU GLN
 GTA AAG GGT GGC GTT AGT CAT TTT ATT ATT AGT GGC TAT CGA GAC TTT GAT GAG CAA
 9481 SER VAL LEU TYR GLN GLU MET GLY ALA GLU TYR ALA LEU PRO ALA GLY TYR SER GLU HIS
 AGT GTG CTT TAC CAA GAA ATG GGG GCT GAG TAT GCC TTA CCA GCA GGT TAT AGT GAG CAT
 9541 ASN SER GLY LEU SER LEU ASP VAL GLY SER SER LEU THR LYS MET GLU ARG ALA PRO GLU
 AAT TCA GGT TTA TCA CTA GAT GTA GGA TCA AGC TTG ACG AAA ATG GAA CGA GCC CCT GAA
 9601 GLY LYS TRP ILE GLU GLU ASN ALA TRP LYS TYR GLY PHE ILE LEU ARG TYR PRO GLU ASP
 GGA AAG TGG ATA GAA GAA AAT GCT TGG AAA TAC GGG TTC ATT TTA CGT TAT CCA GAG GAC
 9661 LYS THR GLU LEU THR GLY ILE GLN TYR GLU PRO TRP HIS ILE ARG TYR VAL GLY LEU PRO
 AAA ACA GAG TTA ACA GGA ATT CAA TAT GAA CCA TGG CAT ATT CGC TAT GTT GGT TTA CCA
 9721

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (16/23)

HIS SER ALA ILE MET LYS GLU LYS ASN PHE VAL LEU GLU GLU TYR MET ASP TYR LEU LYS
 CAT AGT GCG ATT ATG AAA GAA AAG AAT TTC GTT CTC GAG GAA TAT ATG GAT TAC CTA AAA
 9781
 GLU GLU LYS THR ILE SER VAL SER VAL ASN GLY GLU LYS TYR GLU ILE PHE TYR TYR PRO
 GAA GAA AAA ACC ATT TCT GTT AGT GTA AAT GGG GAA AAA TAT GAG ATC TTT TAT TAT CCT
 9841
 VAL THR LYS ASN THR THR ILE HIS VAL PRO THR ASN LEU ARG TYR GLU ILE SER GLY ASN
 GTT ACT AAA AAT ACC ACC ATT CAT GTG CCG ACT AAT CTT CGT TAT GAG ATA TCA GGA AAC
 9901
 ASN ILE ASP GLY VAL ILE VAL THR VAL PHE PRO GLY SER THR HIS THR ASN SER ARG ARG
 AAT ATA GAC GGT GTA ATT GTG ACA GTG TTT CCC GGA TCA ACA CAT ACT AAT TCA AGG AGG
 9961
 TAA GGA TGG CGG AAT GAA ACC AAC GAA ATT AAT GAA CAG CAT TAT TGT ACT AGC ACT TTT
 10021
 GGG GTA ACG TTA GCT TTT TAA TTT AAA ACC CAC GTT AAC TAG GAC ATT GCT ATA CTA ATG
 10081
 ATA CAA CTT AAA CAA AAG AATTAGAGG AAA TTA TA TTG GGA AAA ATA TTA TCT AGA GGA TTG
 10143
 LEU ALA LEU TYR LEU VAL THR LEU ILE TRP LEU VAL LEU PHE LYS LEU GLN TYR ASN ILE
 CTA GCT TTA TAT TTA GTG ACA CTA ATC TGG TTA GTG TTA TTC AAA TTA CAA TAC AAT ATT
 10203
 LEU SER VAL PHE ASN TYR HIS GLN ARG SER LEU ASN LEU THR PRO PHE THR ALA THR GLY
 TTA TCA GTA TTT AAT TAT CAT CAA AGA AGT CTT AAC TTG ACT CCA TTT ACT GCT ACT GGG
 10263
 ASN PHE ARG GLU MET ILE ASP ASN VAL ILE ILE PHE ILE PRO PHE GLY LEU LEU ASN
 AAT TTC AGA GAG ATG ATA GAT AAT GTT ATA ATC TTT ATT CCA TTT GGC TTG CTT TTG AAT

VanZ

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8(17/23)

10323 VAL ASN PHE LYS GLU ILE GLY PHE LEU PRO LYS PHE ALA PHE VAL LEU VAL LEU SER LEU
 GTC AAT TTT AAA GAA ATC GGA TTT TTA CCT AAG TTT GCT TTT GTA CTG GTT TTA AGT CTT
 10383 THR PHE GLU ILE ILE GLN PHE ILE PHE ALA ILE GLY ALA THR ASP ILE THR ASP VAL ILE
 ACT TTT GAA ATA ATT CAA TTT ATC TTC GCT ATT GGA GCG ACA GAC ATA ACA GAT GTA ATT
 10443 THR ASN THR VAL GLY GLY PHE LEU GLY LEU LYS LEU TYR GLY LEU SER ASN LYS HIS MET
 ACA AAT ACT GTT GGA GGC TTT CTT GGA CTG AAA TTA TAT GGT TTA AGC AAT AAG CAT ATG
 10503 ASN GLN LYS LYS LEU ASP ARG VAL ILE ILE PHE VAL GLY ILE LEU LEU VAL LEU LEU
 AAT CAA AAA AAA TTA GAC AGA GTT ATT ATT TTT GTG GGT ATA CTT TTG CTC GTA TTA TTG
 10563 LEU VAL TYR ARG THR HIS LEU ARG ILE ASN TYR VAL
 CTC GTT TAC CGT ACC CAT TTA AGA ATA AAT TAC GTG TAAG ATG TCT AAA TCA AGC AAT
 10621 CTG ATC TTT CAT ACA CAT AAA GAT ATT GAA TGA ATT GGA TTA GAT GGA AAA CGG GAT GTG
 10681 GGG AAA CTC GCC CGT AGG TGT GAA GTG AGG GGA AAA CCG GTG ATA AAG TAA AAA GCT TAC
 10741 CTA ACA CTA TAG TAA CAA AGA AAG CCC AAT TAT CAA TTT TAG TGC TGA GGA ATT GGT CTC
 10801 TTT AAT AAA TTT CCT TAA CGT TGT AAA TCC GCA TTT TCC TGA CGG TAC CCC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (18/23)

Ib brin(-)

1 CAA AAT ATC ACC TCA TTT TTG AGA CAA GTC TTA TGA GAC GCT CTT AAC TAT GAT TTT ATC
 61 AGT CTA CTA CAT TTG TAT CAA TAG AGT ACA CTC TAT TGA TAT ATA ATT GAA CTA ATA AAT
 121 **Transposase** MET LYS ILE ALA ARG GLY ARG GLU LEU LEU THR
 TGA AAA TAC AGA AAT GGA ATGATACTG AA ATG AAA ATT GCG AGA GGT AGA GAA TTG CTT ACA
 182 PRO GLU GLN ARG GLN ALA PHE MET GLN ILE PRO GLU ASP GLU TRP ILE LEU GLY THR TYR
 CCG GAA CAG AGA CAG GCT TTT ATG CAA ATC CCT GAA GAT GAA TGG ATA CTG GGG ACC TAC
 242 PHE THR PHE SER LYS ARG ASP LEU GLU ILE VAL ASN LYS ARG ARG GLU GLU ASN ARG
 TTC ACT TTT TCC AAA CCG GAT TTA GAA ATA GTT AAT AAG CGA AGG GAA GAA AAC CGT
 302 LEU GLY PHE ALA VAL GLN LEU ALA VAL LEU ARG TYR PRO GLY TRP PRO TYR THR HIS ILE
 TTA GGA TTT GCT GTT CAA TTA GCT GTT CTT CGG TAT CCC GGT TGG CCA TAC ACT CAT ATC
 362 LYS SER ILE PRO ASP SER VAL ILE GLN TYR ILE SER LYS GLN ILE GLY VAL SER PRO SER
 AAA AGC ATC CCA GAT TCG GTC ATA CAA TAT ATA TCG AAA CAG ATT GGT GTT AGT CCA TCC
 422 SER LEU ASP HIS TYR PRO GLN ARG GLU ASN THR LEU TRP ASP HIS LEU LYS GLU ILE ARG
 TCG CTT GAT CAT TAT CCT CCA AGG GAA AAT ACA CTT TGG GAT CAT TTG AAA GAA ATT CGA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (19/23)

482 SER GLU TYR ASP PHE VAL THR PHE THR LEU SER GLU TYR ARG MET THR PHE LYS TYR LEU
 AGT GAA TAC GAC TTT GTA ACT TTT ACC CTG AGT GAA TAT CGA ATG ACA TTT AAG TAC CTT
 542
 HIS GLN LEU ALA LEU GLU ASN GLY ASP ALA ILE HIS LEU LEU HIS GLU CYS ILE ASP PHE
 CAT CAA TTA GCT TTG GAA AAT GGT GAT GCC ATT CAT CTA CTG CAT GAA TGC ATA GAT TTT
 602
 LEU ARG LYS ASN LYS ILE ILE LEU PRO ALA ILE THR THR LEU GLU ARG MET VAL TRP GLU
 CTA AGA AAA AAC AAA ATT ATA CTG CCT GCT ATC ACT ACA CTT GAA AGA ATG GTG TGG GAA
 662
 ALA ARG ALA MET ALA GLU LYS LYS LEU PHE ASN THR VAL SER LYS SER LEU THR ASN GLU
 GCA AGG GCA ATG GCT GAA AAG AAG CTA TTT AAT ACG GTT AGT AAA TCT CTA ACA AAT GAG
 722
 GLN LYS GLU LYS LEU GLU GLY ILE ILE THR SER GLN HIS PRO SER GLU SER ASN LYS THR
 CAA AAA GAA AAG CTT GAA GGG ATT ATT ACC TCG CAG CAT CCA TCC GAA TCC AAT AAA ACG
 782
 ILE LEU GLY TRP LEU LYS GLU PRO PRO GLY HIS PRO SER PRO GLU THR PHE LEU LYS ILE
 ATA TTG GGT TGG TTA AAA GAG CCA CCG GGT CAT CCT TCA CCC GAA ACT TTT CTA AAA ATA
 842
 ILE GLU ARG LEU GLU TYR ILE ARG GLY MET ASP LEU GLU THR VAL GLN ILE SER HIS LEU
 ATA GAA CGA CTC GAA TAC ATA CGA GGA ATG GAT TTA GAA ACA GTG CAA ATT AGT CAT TTG
 902
 HIS ARG ASN ARG LEU LEU GLN LEU SER ARG LEU GLY SER ARG TYR GLU PRO TYR ALA PHE
 CAC CGT AAC CGC CTG TTG CAG CTG TCT CGC TTA GGC TCA AGA TAC GAG CCG TAT GCA TTC
 962
 ARG ASP PHE GLN GLU ASN LYS ARG TYR SER ILE LEU THR ILE TYR LEU LEU GLN LEU THR
 CGT GAC TTT CAA GAA AAT AAA CGT TAT TCG ATA TTA ACC ATC TAT TTA TTA CAA CTT ACT
 1022
 GLN GLU LEU THR ASP LYS ALA PHE GLU ILE HIS ASP ARG GLN ILE LEU SER LEU LEU SER
 CAG GAG CTA ACG GAT AAA GCG TTT GAA ATT CAT GAT AGG CAA ATA CTT AGT TTG TTA TCA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (20/23)

1082 LYS GLY ARG LYS ALA GLN GLU GLU ILE GLN LYS GLN ASN GLY LYS LYS LEU ASN GLU LYS
 AAA GGT CGT AAG GCT CAA GAG GAA ATC CAG AAA CAA AAC GGT AAA AAG CTA AAT GAG AAA
 1142 VAL ILE HIS PHE THR ASN ILE GLY GLN ALA LEU ILE LYS ALA ARG GLU GLU LYS LEU ASP
 GTT ATA CAC TTT ACG AAC ATC GGA CAA GCA TTA ATT AAA GCA AGA GAG GAA AAA TTA GAC
 1202 VAL PHE LYS VAL LEU GLU SER VAL ILE GLU TRP ASN THR PHE VAL SER SER VAL GLU GLU
 GTT TTT AAG GTT TTA GAA TCG GTT ATT GAA TGG AAT ACC TTT GTC TCT TCA GTA GAA GAG
 1262 ALA GLN GLU LEU ALA ARG PRO ALA ASP TYR ASP TYR LEU ASP LEU LEU GLN LYS ARG PHE
 GCT CAG GAA CTT GCA CGT CCT GCC GAC TAT GAT TAT TTA GAC TTA CTG CAA AAA CGG TTT
 1322 TYR SER LEU ARG LYS TYR THR PRO THR LEU LEU ARG VAL LEU GLU PHE HIS SER THR LYS
 TAT TCA CTA AGA AAA TAT ACG CCA ACG CTA TTA AGA GTA TTG GAA TTT CAT TCT ACA AAG
 1382 ALA ASN GLU PRO LEU LEU GLN ALA VAL GLU ILE ILE ARG GLY MET ASN GLU SER GLY LYS
 GCA AAT GAG CCA CTT TTA CAA GCT GTT GAG ATT ATC CGA GGA ATG AAC GAA TCT GGA AAG
 1442 ARG LYS VAL PRO ASP ASP SER PRO VAL ASP PHE ILE SER LYS ARG TRP LYS ARG HIS LEU
 CGA AAA GTG CCT GAT GAT GAC TCA CCT GTG GAT TTT ATT TCA AAA CGA TGG AAA AGA CAT TTA
 1502 TYR GLU ASP ASP GLY THR THR ILE ASN ARG HIS TYR TYR GLU MET ALA VAL LEU THR GLU
 TAC GAG GAT GAT GGT ACA ACA ATT AAT CGT CAT TAC TAT GAA ATG GCT GTT TTA ACA GAA
 1562 LEU ARG GLU HIS VAL ARG ALA GLY ASP VAL SER ILE VAL GLY SER ARG GLN TYR ARG ASP
 CTT CGG GAG CAT GTT CGG GCA GGA GAT GTT TCC ATT GTT GGC AGC AGA CAA TAT AGG GAT

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (21/23)

1622 PHE GLU GLU TYR LEU PHE SER GLU ASP THR TRP ASN GLN SER LYS GLY ASN THR ARG LEU
 TTT GAG GAA TAT TTG TTT TCG GAA GAT ACA TGG AAT CAA TCG AAG GGG AAT ACG AGA TTA
 1682 SER VAL SER LEU SER PHE GLU ASP TYR ILE THR GLU ARG THR SER SER PHE ASN GLU ARG
 TCA GTT AGT TTA TCA TTC GAA GAT TAT ATA ACG GAG AGA ACC AGC AGC TTT AAT GAA AGG
 1742 LEU LYS TRP LEU ALA ALA ASN SER ASN LYS LEU ASP GLY VAL SER LEU GLU LYS GLY LYS
 TTA AAG TGG TTA GCT GCC AAT TCC AAT AAG TTA GAT GGG GTT TCT CTT GAA AAA GGA AAG
 1802 LEU SER LEU ALA ARG LEU GLU LYS ASP VAL PRO GLU GLU ALA LYS LYS PHE SER ALA SER
 CTA TCA CTT GCA CGC TTA GAA AAA GAT GTT CCA GAA GAA GCA AAA AAA TTT AGT GCA AGC
 1862 LEU TYR GLN MET LEU PRO ARG ILE LYS LEU THR ASP LEU MET ASP VAL ALA HIS ILE
 CTT TAT CAG ATG CTA CCA AGA ATA AAA TTA ACT GAT TTA CTC ATG GAT GTG GCC CAT ATA
 1922 THR GLY PHE HIS GLU GLN PHE THR HIS ALA SER ASN ASN ARG LYS PRO ASP LYS GLU GLU
 ACA GGA TTT CAT GAG CAA TTC ACT CAT GCT GCT TCC AAT AAT CCA AAA CCA GAT AAG GAA GAA
 1982 THR ILE ILE ILE MET ALA ALA LEU LEU GLY MET GLY MET ASN ILE GLY LEU SER LYS MET
 ACA ATC ATT ATC ATG GCT GCC CTT TTA GGA ATG GGA ATG AAT ATT GGC TTG AGC AAG ATG
 2042 ALA GLU ALA THR PRO GLY LEU THR TYR LYS GLN LEU ALA ASN VAL SER GLN TRP ARG MET
 GCC GAA GCC ACA CCC GGA CTT ACA TAT AAG CAA CTA GCC AAT GTA TCT CAA TGG CGC ATG
 2102 TYR GLU ASP ALA MET ASN LYS ALA GLN ALA ILE LEU VAL ASN PHE HIS LYS LEU GLN
 TAT GAA GAT GCC ATG AAT AAA GCC CAA GCC ATA TTA GTA AAC TTT CAT CAT AAA TTA CAA
 2162 LEU PRO PHE TYR TRP GLY ASP GLY THR THR SER SER ASP GLY MET ARG MET GLN LEU
 TTG CCT TTC TAT TGG GGC GAC GGT ACA ACA TCT TCG TCA GAT GGT ATG AGA ATG CAG CTA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (22/23)

2222 GLY VAL SER SER LEU HIS ALA ASP ALA ASN PRO HIS TYR GLY THR GLY LYS GLY ALA THR
 GGT GTT TCA TCA CTA CAT GCA GAT GCA AAT CCA CAT TAT GGA ACT GGA AAA GGA GCC ACC
 2282 ILE TYR ARG PHE THR SER ASP GLN PHE SER SER TYR TYR THR LYS ILE ILE HIS THR ASN
 ATC TAC CGA TTT ACA AGT GAT CAA TTC TCT TCT TAC TAC ACA AAG ATT ATT CAT ACT AAT
 2342 SER ARG ASP ALA ILE HIS VAL LEU ASP GLY LEU LEU HIS HIS GLU THR ASP LEU ASN ILE
 TCA AGA GAT GCG ATT CAT GTT TTG GAT GGT TTG TTA CAT CAT GAG ACG GAT CTA AAC ATA
 2402 GLU GLU HIS TYR THR ASP THR ALA GLY TYR THR ASP GLN ILE PHE GLY LEU THR HIS LEU
 GAG GAA CAT TAT ACA GAC ACT GCC GGT TAC ACT GAC CAA ATA TTC GGA CTG ACT CAT TTA
 2462 LEU GLY PHE LYS PHE ALA PRO ARG ILE ARG ASP LEU SER ASP SER LYS LEU PHE THR ILE
 TTA GGA TTT AAA TTT GCC CCA AGA ATA AGG GAT TTA TCG GAC TCA AAA TTA TTT ACG ATA
 2522 ASP LYS ALA SER GLU TYR PRO LYS LEU GLU ALA ILE LEU ARG GLY GLN ILE ASN THR LYS
 GAT AAA GCA AGT GAG TAT CCA AAA CTA GAA GCC ATT TTA CGT GGA CAA ATA AAT ACA AAG
 2582 VAL ILE LYS GLU ASN TYR GLU ASP VAL LEU ARG LEU ALA HIS SER ILE ARG GLU GLY THR
 GTC ATT AAA GAA AAT TAT GAG GAT GTT TTG CGA TTA GCT CAT TCT ATA AGG GAG GGA ACA
 2642 AGT TTC AGC ATC CCT TAT TAT GGG GAA GCT AGG TTC CTA TTC AAG ACA AAA CAG CTT AGC
 VAL SER ALA SER LEU ILE MET GLY LYS LEU GLY SER TYR SER ARG GLN ASN SER LEU ALA
 GTT TCA GCA TCC CTT ATT ATG GGG AAG CTA GGT TCC TAT TCA AGA CAA AAC AGC TTA GCT
 2702 THR ALA LEU ARG GLU MET GLY ARG ILE GLU LYS THR ILE PHE ILE LEU ASN TYR ILE SER
 ACA GCC TTA CGT GAG ATG GGC CGA ATA GAA AAA ACG ATC TTT ATT TTG AAT TAT ATA TCG

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 8 (23/23)

2762 ASP GLU SER LEU ARG ARG LYS ILE GLN ARG GLY LEU ASN LYS GLY GLU ALA MET ASN GLY
 GAT GAA TCA TTA AGA AGA AAA ATA CAA AGA GGA TTG AAT AAA GGA GAA GCC ATG AAT GGA
 2822 LEU ALA ARG ALA ILE PHE PHE GLY LYS GLN GLY LEU ARG GLU ARG THR ILE GLN HIS
 TTG GCA AGA GCT ATT TTC TTC GGA AAA CAA GGT GAG CTT AGA GAA CGC ACC ATA CAG CAT
 2882 GLN LEU GLN ARG ALA SER ALA LEU ASN ILE ILE ILE ASN ALA ILE SER ILE TRP ASN THR
 CAA TTG CAA AGA GCC AGT GCT TTA AAC ATA ATT ATC AAT GCT ATA AGT ATT TGG AAT ACT
 2942 TCT CCA CCT AAC AAC AGC AGT TGA ATA TAA AAA ACG GAC AGG TAG CTT TAA TGA AGA TTT
 LEU HIS LEU THR THR ALA VAL GLU TYR LYS LYS ARG THR GLY SER PHE ASN GLU ASP LEU
 CTC CAC CTA ACA ACA GCA GTT GAA TAT AAA AAA CGG ACA GGT AGC TTT AAT GAA GAT TTG
 3002 LEU HIS HIS MET SER PRO LEU GLY TRP GLU HIS ILE ASN LEU LEU GLY GLU TYR HIS PHE
 TTA CAC CAT ATG TCG CCC TTA GGT TGG GAA CAT ATT AAT TTA CTA GGA GAA TAC CAT TTT
 3062 ASN SER GLU LYS VAL SER LEU ASN SER LEU ARG PRO LEU LYS LEU SER
 AAC TCA GAG AAA GTA GTC TCA TTA AAT TCT TTA AGA CCA CTA AAA CTT TCT TAA CGT TG
 3121 TTA AAA ACG AGG GAT TCG TCA GGA AAA TAG GCT TAG CGT TGT AAA TCC GCA TTT TCC TGA
 3181 CGC TAC CCC

FEUILLE DE REMPLACEMENT

[illegible]

FIGURE 9(1/2)

I F I K P N E A G S S K G I T K V T D K
 ATCTTTATCAAGCCGAATGAAGCCGGTTCTTCAAAAGGGATCACAAAAGTAACAGACAAA
 784
 T A L Q S A L T T A F A Y G S T V L I Q
 ACAGCGCTCCAATCTGCATTAACGACTGCTTTTGCTTACGGTCTACTGTGTGATCCAA
 844
 K A I A G I E I G C G I L G N E Q L T I
 AAGCGGATAGCGGGTATTGAAATTGGCTGCGGCATCTTAGGAAATGAGCAATTGACGATT
 904
 G A C D A I S L V D G F F D F E E K Y Q
 GGTGCTTGATGCGGATTTCTTGTGCGACGGTTTTTTTGATTTTGAAGAGAAATACCAA
 964
 L I S A T I T V P A P L P L A L E S Q I
 TTAATCAGCGCCACGATCACTGTCCAGCACCATTCCTCTCGCGCTTGAAATCACAGATC
 1024
 K E Q A Q L L Y R N L G L T G L A R I D
 AAGAGCAGGCACAGCTGCTTTATCGAAACTTGGGATTTGACGGGTCTGGCTCGAATCGAT
 1084
 F F V T N Q G A I Y L N E I N T M P G F
 TTTTTCGTCACCAATCAAGGAGCGGATTTATTAAACGAAATCAACACCATGCGCGGATTT
 1144
 T G H S R Y P A M M A E V G L S Y E I L
 ACTGGGCACTCCGCTACCCAGCTATGATGGCGGAAGTCCGGTTATCCTACGAAATATA
 1204
 V E Q L E A L A E E D K R *
 GTAGAGCAATTGATTGCACCTGGCAGGAGGACAAACGATGAACACATTACAATTGATCAATA
 1267
 AAAACCATCCATTGAAAAAATCAAGAGCCCCCGCACTTAGTGCTAGCTCCTTTTAGCGATCAGCATG
 1336
 TTTACCTGCAG
 Pst I
 1347

FIGURE 9 (2/2)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Vanc	--MKKIAVLFGGNSPEYSVS L7SAASVIOA IDPLKYEVMT IGIAPTMDWY WYQGNLANVR NDTWLEDHKN CHQLTFSSQG FILGEKRIVP -----D
Vana	MNRUKVAILF GGCSEEHDS VKSAIEIAAN INKEKEYPLY IGITKSGVMK MCEKPCAWE NDNCYSAVLS PDKKMHGLLV KKNHEYEINH -----VD
Ddla	MEKLVRGIVF GCHSNEHEVS LQSAKNIVDA IDKSDFDVVL LGIDKGQGMH VSDASHYLLN ADDPAHIALR PSATSLAQVP GKHEHQDLIDA QNGOPLPTVD -----
DdlB	-MTDKIAVLL GGTSAREVS LNSGAAVLAG LREGGIDAYP VDPKEVDVTQ LKSMGFQKV-----
	CCCCC II I I I I C C C C C C C domaine 1
Vanc	<--1--> VLFPVLHGKY GEDGCIQGLL EIMNLPUVC HVAASALCMN KWLHLQADT MGIASAPTL LSRVEND--- PATIDRFIOD HGFFIFIKPN EAGSSKGITK
Vana	VAFSALHGKS GEDGSIQGLF ELSGIPFVGC DIQSSAICMD KSLTYIVAKN AGIATPAFWV INKDDRP----VAAT FTYPVFVKPA RSGSSFVGKK
Ddla	VIFPIVHGTL GEDGSLOGML RVANLPFVGS DVLASAACHD KOVTKRLIRD AGLNIAPFIT LTRANRHNIS FAE---VESK LGPLFLVKPA NQGSVVGVSK
DdlB	--FIALHGRG GEDGTLOGML EIMGLPYTGS GVMAALSMD KLRSKILLMOG AGLVPAPWA LTRAEFEKGL SDKQLAEISA LGLPVIVKPS REGSSVGMCK I CII IIIICIIICC CI IC C II CI I C IC CCC domaine 2
Vanc	VTDKTALOSA LTAFAYGST VLIQKAIGI EIGCGILGNE -OLTIGACDA ISLVDCFFDF EEKYLIS-- --ATTVPAP LPALAESQIK EQAQLLYRNL
Vana	VNSADELDYA IESARQYDSK ILIEQAVSGC EVGCAVLGNS AALVVGEVDQ IRLQYGIFRI HQVEPEKGS ENAVITVPAD LSNERGRIQ ETAKKIYRAL
Ddla	VTSEEQYATA VALAFEFDHK VIVEOGIKGR EIECAVLGND NP-----QAST CGEIVLTSDF YAYDTKYIDE DGAKVVVPAA IAPEINDKIR AIYAVQAYQIL
DdlB	VVAENALODA LRlafQHDEE VLIEKWLSGP EFTVALIGEE IL-----P SIRIQPGCTF YDYEA KYLSD ETOYFC-PAG LEASQEANLQ ALVLKAWTLL I I C I CCC CC I IC CCII domaine 3
Vanc	GLTGlarIDF FVTNQGAiYL NEINTMPGET GHsRYpAMMA EVGLSYELLV EQLIALAED KR <-2-->
Vana	GCRGLARVDM FLQDNGRIVL NEVNTLPGET SYsRYPRMMA AAGIALPELI DRlIVLALKG
Ddla	GCAGMARVDV FLTPENEVVI NEINTLPGET NiSMYPKLWQ ASGLGYTDLI TRlIELALER HAANNALKTt M
DdlB	GCKGWGRIDV MLDSDGQFYl LEANTSPGMT SHSLVPMAAR QAGMSFSQLV VRILELAD I I CICIC CC C C I II IICI I I IC IC CC II domaine 4

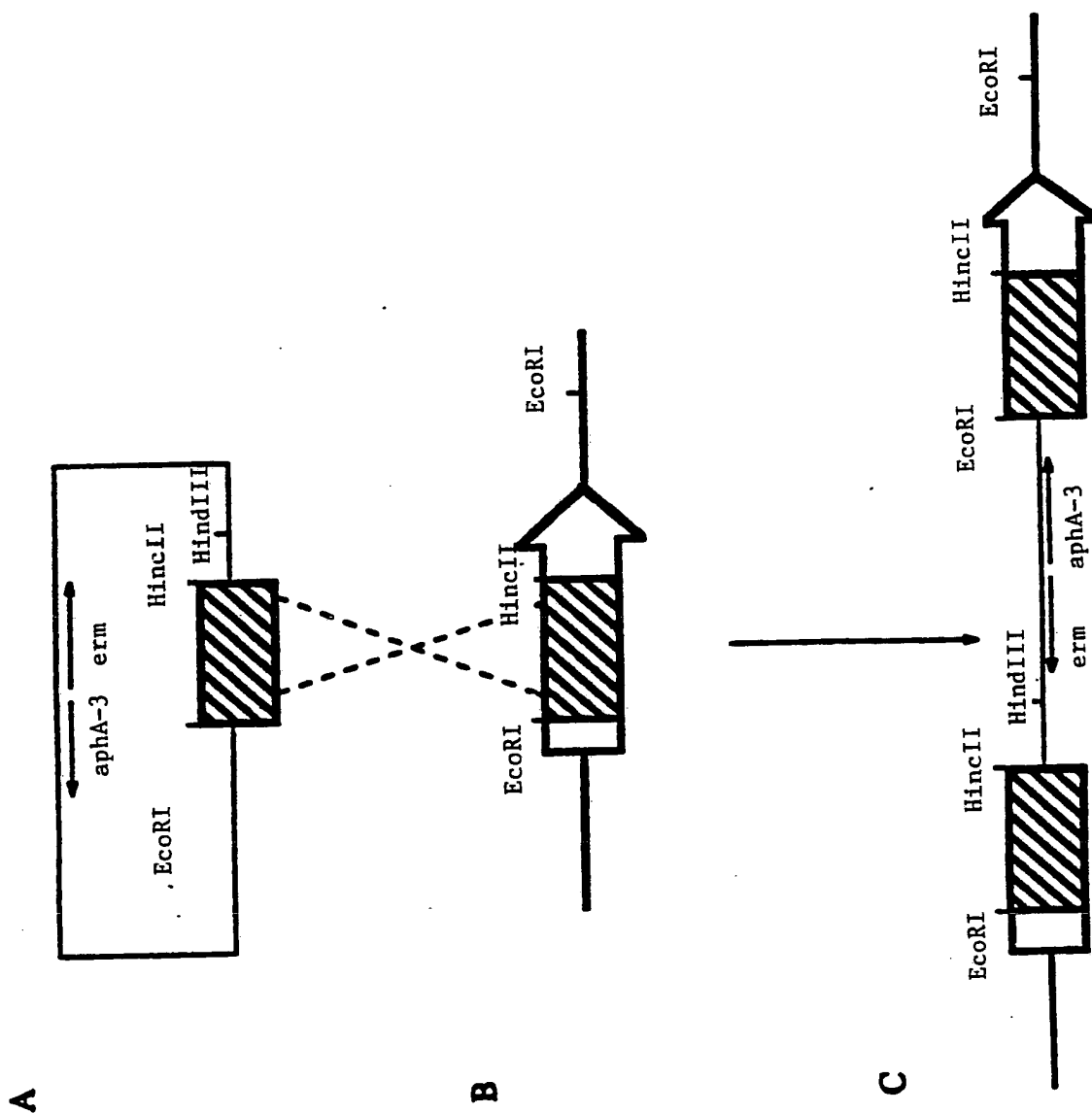
FIGURE 10

65/69



FIGURE 11

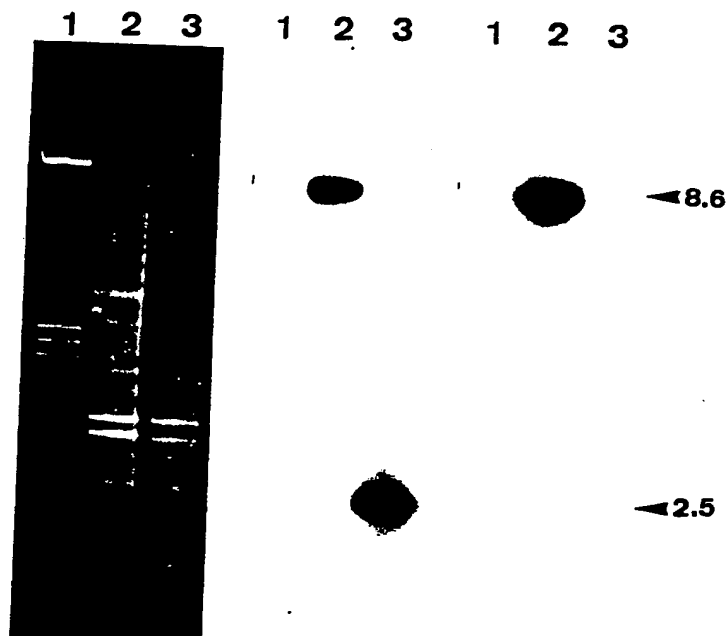
FIGURE 12



FEUILLE DE REMPLACEMENT

67/69

FIGURE 13



FEUILLE DE REMPLACEMENT

VanR	--MSDKIL--	--JVDDHEHIAADLVELYLYLKNENYTVFK--	YTTAKEALECIDKSEIDLAILD	IML	56
OmpR	MQENYKIL--	--VVDDEMRRLRALLEHYLTQGFQVRS--	VANAQMDRLLTRESFHLMLVLDL	ML	58
PhoB	--MARRIL--	--VVEDEAPIREMVCFLVLEQNGFQPVE--	AEDYDSAVNQLNNEPWPDLILLDWML	ML	56
Chey	--MADKELKFLVVDDE	FSTMRRIVRNLLKELGFNNVEEAEDGVDA	LNLQAGGFGFIISDWNM		60
VanR	PGTISGLTICQKIRDKHTY--	--PIIMLTGKDTEDVKITGLTIGADDYITKPF	PLLEIARVKA		115
OmpR	PGEDGLSICRRLRSQSNPM--	--PIIMVTAKGEEVDRIVGLEIGADDYIPKPF	NPRELLARIRA		118
PhoB	PGSGIQFIKHLKRESMTRDI	IPVVMLTARGEEEDRVRGLETTGADDYITKPF	SPKELVARIKA		118
Chey	PNMDGLELLKTIRADSAMSALPVL	MVTA EAKKENIIAAQA GAGSYVVKPF	TAAATLEELNK		122
VanR	QLRRYKK-FSGVKEQNNENVI	VHSGLVINVNTHCYLNEKQLSLTPTEFS	ILRICENKGNVV		176
OmpR	VLRRQANELPGAPSQEEAVI	AFGKFKLNLGTRMFREDEPMP	LTSGEFAVLKALVSHPREPL		180
PhoB	VMRRI SP-----MAVEEVI	EMQGLSLDPTSHRVMAGEEPL	EMGPTTEFKLLHFFMTHPERVY		174
Chey	IFEKLG M 129				
VanR	SSELFLFHEIWGD EYFSKSNN	TTVHIRHLREKMNNDTIDNPKYIK	TVWGVGYKIEK		231
OmpR	SRDKLMNLARGREYSAMER-S	IDVQIISRRLRMVEEDPAHPRYIQT	VWGLGYVFPDGSKA		239
PhoB	SREQLLNHVWGTNVYVEDR-T	VDVHIRRLR-KALEPGGHRM	QTVRGTYRFS		229

FIGURE 15

FEUILLE DE REMPLACEMENT

[illegible]

FIGURE 14

FEUILLE DE REMPLACEMENT

[illegible]

FIGURE 14

VanR	--MSDKIL--	I	VDDDEHEIADLVELYLKKNENYTVFK--YYTAKAEALCEIDKSEIDLAI	LDIML	56
OmpR	MQENYKIL--	V	VDDDMRLRALLEIRYLTEQQGFQVRS-VANAEQMDRLLTRESEFHLMLVLDLM	L	58
PhoB	--MARRIL--	V	EDEAPIREMVCFLQNGCFQPVE-AEDYDSAVNQLNRPWPDILLDWML	L	56
Chey	--MADKELKFLVVDDEFSTMRRIRVRNLLKELGFNNVEEAEDGVDALENKLQAGGFGFIISDWNM				60
VanR	PGTSSGLTICQKIIRDKHXY--PIIMLTGKDTEVDKIITGLTI	GADDYITKPFRRP	LELIAARVKA	115	
OmpR	PGE DGLSICRRLRSSNPMM--PIIMVTAKGEEVDRI	VGLEIGADDYIPKPFNPREL	LARIARA	118	
PhoB	PGGSIGIOFIKHLKRSMTRDI	PVVMLTARGEEEDRVRGLETGADDYITKPFSPKEL	VARIKA	118	
Chey	PNM DGLLELLKTIRADSAMSALPVLMVTA	EAKKENIIAAQA	GASGYVVVKPFETAATLEEKLNK	122	
VanR	QLRRRYKK-FSGVKEQNENVI	VHSGLVINVN	THECYLNEKQLSLTPTEFSILRLCENKGNV	176	
OmpR	VLRRQANELPGAPSQE	EAVIAFGKFCLNLGTREMFRED	EPMP L TSGEF AVL KAL VSHPREPL	180	
PhoB	VMRRISP----	MAVEEVIEMQGLSLDPTSHRVMAGEEP	LEMGPTEFKLLHFFMTHPERVY	174	
Chey	IFEKLG M	129			
VanR	SSEL LFHEIWGD EY FSKSNNTITVHIRHLR	EKMNDTIDNPKYIK	TVWG VGYKIEK	231	
OmpR	SRDKL MNLAR GREYSAMER-SIDVQISR	LR RMVEEDPAHPRYIQ	TVWG LGYVFVPDGSKA	239	
PhoB	SREQ LLNHVWG TNVYVEDR-TVDVHIRRLR-KA	LEPGGHDRMVQT	VRGGTG YRFSTFR	229	

FIGURE 15

FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 91/00855

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *			
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC			
Int.Cl.5	C 12 N 15/52 C 12 Q 1/68	C 12 N 15/31 C 12 P 21/02	C 12 Q 1/25 C 07 K 13/00
			C 12 Q 1/32 C 12 P 21/08
II. FIELDS SEARCHED			
Minimum Documentation Searched ⁷			
Classification System	Classification Symbols		
Int.Cl.5	C 07 K C 12 P	C 12 N	C 12 Q
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *			
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²		Relevant to Claim No. ¹³
X	Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 34, No. 5, May 1990, American Society for Microbiology; A. Brisson-Noel et al.: "Cloning and heterospecific expression of the resistance determinant vanA encoding high-level resistance to glycopeptides in enterococcus faecium BM4147", pages 924-927, see the whole document (cited in the application)		7-17, 19
A			1-6
Y			20-22, 24, 27- 28
-/-			
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>			
IV. CERTIFICATION			
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report	
18 February 1992 (18.02.92)		4 March 1992 (04.03.92)	
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer	
European Patent Office			

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 1985)

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 34, No. 10, October 1990, American Society for Microbiology; S. Dutka-Malen et al.: "Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in Gram-positive bacteria", pages 1875-1879, see the whole document	8-14, 20-22, 24
Y	---	20-22, 24
Y	EP, A, 0229701 (CETUS CORPORATION) 22 July 1987, see the whole document (cited in the application) ---	27-28
A	Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 33, No. 1, January 1989, American Society for Microbiology; R. Leclercq et al.: "Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in enterococcus faecium", pages 10-15, see particularly page 13, left hand column, last paragraph to right hand column, paragraph 2 ---	
P, X	Mol. Gen. Genet., vol. 224, No. 3, December 1990, Springer Verlag, S. Dutka-Malen et al.: "The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes", pages 364-372, see the whole document	7, 9, 13-14, 16-19
P, X	Biochemistry, vol. 30, No. 8, 26 February 1991, American Chemical Society; T.D.H. Bugg et al.: "Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine:D-alanine ligase of altered substrate specificity", pages 2017-2021, see the whole document -----	7, 9, 13-14, 16-19

FR 9100855
SA 53696

EPO FORM P0479

BNSDOCID: <WO 9207942A1 | >

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00855

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous)⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

Int.C1.5	C 12 N 15/52	C 12 N 15/31	C 12 Q 1/25
C 12 Q 1/32	C 12 Q 1/68	C 12 P 21/02	C 07 K 13/00
C 12 P 21/08			

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification	Symboles de classification
Int.C1.5	C 07 K C 12 P C 12 N C 12 Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	Antimicrobial Agents and Chemotherapy, volume 34, no. 5, mai 1990, American Society for Microbiology; A. Brisson-Noel et al.: "Cloning and heterospecific expression of the resistance determinant vanA encoding high-level resistance to glycopeptides in enterococcus faecium BM4147", pages 924-927, voir le document en entier (cité dans la demande)	7-17,19
A		1-6
Y	-/-	20-22, 24,27- 28

^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18-02-1992

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04.03.92

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

Nicole De Bie

III. DOCUMENTS C NSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
X	Antimicrobial Agents and Chemotherapy, volume 34, no. 10, octobre 1990, American Society for Microbiology; S. Dutka-Malen et al.: "Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in Gram-positive bacteria", pages 1875-1879, voir le document en entier	8-14,20-22,24
Y	---	20-22, 24
Y	EP,A,0229701 (CETUS CORPORATION) 22 juillet 1987, voir le document en entier (cité dans la demande) ---	27-28
A	Antimicrobial Agents and Chemotherapy, volume 33, no. 1, janvier 1989, American Society for Microbiology; R. Leclercq et al.: "Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in enterococcus faecium", pages 10-15, voir particulièrement page 13, colonne de gauche, dernier paragraphe à colonne de droite, paragraphe 2 ---	
P,X	Mol. Gen. Genet., volume 224, no. 3, décembre 1990, Springer Verlag, S. Dutka-Malen et al.: "The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes", pages 364-372, voir le document en entier ---	7,9,13-14,16-19
P,X	Biochemistry, volume 30, no. 8, 26 février 1991, American Chemical Society; T.D.H. Bugg et al.: "Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine:D-alanine ligase of altered substrate specificity", pages 2017-2021, voir le document en entier -----	7,9,13-14,16-19

FR 9100855
SA 53696

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26/02/92
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

RPO FORM PO472

BNSDOCID: <WO 9207942A1 | >